

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 6月19日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-184284

出 願 人

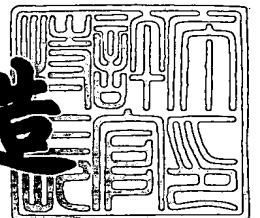
Applicant(s):

日本ケミカルリサーチ株式会社

2001年12月28日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3112010

【書類名】 特許願

【整理番号】 P130-01

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県芦屋市若葉町 5 番第 5 街区第 2 号棟第 2 4 1 2 号  
                        室

    【氏名】 和田 学

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県芦屋市若葉町 5 番第 5 街区第 2 号棟第 2 4 1 2 号  
                        室

    【氏名】 和田 直子

【特許出願人】

    【識別番号】 000228545

    【氏名又は名称】 日本ケミカルリサーチ株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100104639

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 早坂 巧

【先の出願に基づく優先権主張】

    【出願番号】 特願2001- 42655

    【出願日】 平成13年 2月20日

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 063326

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

    【包括委任状番号】 9803334

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗H I V 剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CD 8 7 に対するリガンドを有効成分として含むことを特徴とする、抗H I V 剤。

【請求項 2】

CD 8 7 に対するリガンドが、高分子量ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクティベーターである、請求項 1 の抗H I V 剤。

【請求項 3】

CD 8 7 に対するリガンドが、高分子量ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクティベーターの、CD 8 7 に特異的な結合性を有する断片又は類縁体である、請求項 1 の抗H I V 剤。

【請求項 4】

CD 8 7 に対するリガンドがA T F である、請求項 1 の抗H I V 剤。

【請求項 5】

CD 8 7 に対するリガンドが、A T F の、CD 8 7 に特異的な結合性を有する断片又は類縁体である、請求項 1 の抗H I V 剤。

【請求項 6】

CD 8 7 に対するリガンドが抗CD 8 7 抗体である、請求項 1 の抗H I V 剤。

【請求項 7】

CD 8 7 に対するリガンドが抗CD 8 7 抗体の、CD 8 7 に特異的な結合性を有する断片又は類縁体である、請求項 1 の抗H I V 剤。

【請求項 8】

有効成分としてA T F、又はCD 8 7 に特異的な結合性を有するA T F の断片若しくは類縁体を含有することを特徴とする、医薬組成物。

【請求項 9】

CD 8 7 に被検物質を接触させ、CD 8 7 に特異的に結合する物質を選択することを特徴とする、抗H I V 薬のスクリーニング方法。

【請求項 1 0】

CD 8 7 に被検物質を接触させて CD 8 7 に特異的に結合する被検物質を選択するステップと、選択された物質に抗 HIV 活性の存することを確認するステップと、抗 HIV 活性の存することの確認された該物質を抗 HIV 薬としてヒトへの投与のために製剤化するステップとを含んでなる、抗 HIV 剤の製造方法。

【請求項 1 1】

持続的 HIV 感染細胞と非感染細胞の共存培養系を用意するステップと、該共存培養系に既知濃度の被験物質を加えて共存培養を行うステップと、該共存培養の上清中に放出される HIV 粒子量を測定するステップと、測定された HIV 粒子量を、被検物質を加えずに行ったとき共存培養の上清中に放出される HIV 粒子量と比較するステップと、該比較に基づき、HIV 粒子の放出を抑制した被検物質を抗 HIV 薬として選択するステップを含むことを特徴とする、抗 HIV 薬のスクリーニング方法。

【請求項 1 2】

持続的 HIV 感染細胞と非感染細胞の共存培養系を用意するステップと、該共存培養系に既知濃度の被験物質を加えて共存培養を行うステップと、該共存培養の上清中に放出される HIV 粒子量を測定するステップと、測定された HIV 粒子量を、被検物質を加えずに行ったとき共存培養の上清中に放出される HIV 粒子量と比較するステップと、該比較に基づき、HIV 粒子の放出を抑制した被検物質を抗 HIV 薬として選択するステップと、該抗 HIV 薬をヒトへの投与のために製剤化するステップとを含む、抗 HIV 剤の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗 HIV 剤に関し、更に詳しくは HIV 感染者における HIV の増殖を抑制するための薬剤に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

後天性免疫不全症候群 (A I D S) の原因ウイルスである HIV は、レトロウ

イルス科レンチウイルス亜科に属するRNAウイルスである。HIVの感染及び増殖は以下の機構で行われる。最初にHIV粒子のエンベロープタンパク質の一つであるgp120が標的細胞表面のCD4に結合する。続いて、それらはコレセプターであるケモカインレセプター（主にマクロファージ表面のCCR5又はT細胞表面のCXCR4）と結合し、gp120、CD4及びケモカインレセプターの複合体を形成する。その後、別のエンベロープタンパク質であるgp41が標的細胞の細胞膜に結合し、エンベロープと細胞膜との膜融合を引き起こし、その結果細胞内にウイルス本体が侵入する。細胞内に侵入したHIVは、脱殻し、次いで自身の有する逆転写酵素の働きで、RNAゲノムから二本鎖DNAであるプロウイルスDNAが合成される。プロウイルスDNAは、やはりウイルス自身の有するインテグラーゼの働きにより、宿主細胞の染色体中に組み込まれる。組み込まれたプロウイルスからは、その5'末端のLTR（Long Terminal Repeat）領域をプロモーターとして、ウイルスmRNAが転写される。このmRNAには、長さの異なった幾つかのものが存在し、それらはウイルスタンパク質を合成するためのものとウイルスゲノムRNAになるものに大別される。ウイルスタンパク質には、ウイルス粒子の構造タンパク質、ウイルスの増殖を促進するタンパク質等が含まれる。例えば、ウイルスタンパク質Tatは、宿主ゲノム中に組み込まれたプロウイルスの5'-LTR領域に結合し、ウイルスRNAの転写を数百倍にも増強させる働きをする。一方、ウイルス粒子の構造タンパク質は、細胞内においてウイルスゲノムRNAと細胞膜近傍で会合し、それによりウイルス粒子が形成（アセンブル）される。アセンブルされたウイルス粒子は、出芽により細胞外へ放出される。このアセンブルと出芽の機構については、未だ不明な点が多い。ウイルス粒子の放出後、粒子内ではプロテアーゼが活性化し、プロセッシングが行われ、その結果、感染価を持つ成熟ウイルスが生じる。以上の過程、すなわち標的細胞表面のCD4への結合から、宿主染色体DNAへの組み込み、増殖及び出芽、成熟の過程を頻繁に繰り返すことにより、HIVは急激に増殖する。HIVの増殖に伴い、宿主のCD4陽性細胞が破壊される。これに対抗して宿主は、新たなCD4陽性細胞を、補充のため急速に増殖させる。感染後の数年間はこの動的平衡状態が維持されるが、やがてはCD4陽性細胞の補充が追い付かなくなり、免疫系全体

が破綻するに至り、AIDSの諸症状が現れる。

【0003】

HIV感染者の体内では、HIVを排除するために様々な免疫応答が行われている。例えば、ウイルス抗原に対する中和抗体の産生や細胞障害性T細胞による感染細胞の排除が挙げられる。それ以外に、CD8陽性細胞が産生する幾つかの液性因子が、HIV感染者の無症候期の維持に大きな役割を果たしていることが知られている (Levy, J.A., et al., Immunol. Today, 17: 217-224(1996), Fauci, A.S., Nature, 384: 529-534(1996))。それらの因子として、既にケモカイン (RANTES、MIP- $\alpha$ 、 $1\beta$ 、SDF-1) やIL-16が同定されているが、それらのみではCD8陽性細胞由来の抗HIV活性の全てを説明できないため、未だ同定されていないHIV抑制因子の存在が示唆されている。

【0004】

ケモカインは、標的細胞 (マクロファージ及びT細胞) へのHIVの侵入を阻害するが、その一方、マクロファージにおいてはケモカインがHIV増殖を促進することを示唆する報告もある。IL-16はHIVの転写を抑制することが知られているが、効果を発揮させるためには極めて高濃度のIL-16の使用が必要とされている。これらはAIDS治療薬として開発されつつはあるが、実用化には至っていない。一方、未だ同定されていない抗HIV因子の一部は、これまでのところHIVの転写を抑制すると推測されているが、その本体が明らかとなっていないため、作用機序そのものについても推測の域を出ない。

【0005】

HIV増殖抑制能を有するとしてこれまで報告されている生体由来因子のHIV増殖抑制率についてまとめると、次の通りである。

(1) RANTES (分子量 7,851) : PM1細胞とHIV-1<sub>BaL</sub>株を用いた場合、0.78 ng/mL (=0.1 nM) で5%、1.56 ng/mL (=0.2 nM) で50%、3.12 ng/mL (=0.4 nM) で90% (Cocchi, F. et al., Science 270: p.1811-1815(1995))。

(2) MIP-1 $\alpha$  (分子量 7,717) : 上記RANTESと同条件下、3.12 ng/mLで0%、6.25 ng/mL (0.8 nM) で5%、12.5 ng/mL (=1.6 nM) で50%、25 ng/mL (3.1 nM) で90% (Cocchi, F. et al., Science 270: p.1811-1815(1995))。



M) で50% (Cocchi, F. et al., 前掲)。

(3) MIP-1 $\beta$  (分子量7,819) : 上記RANTESと同条件下、0.78 ng/mLで0%、1.56 ng/mL (=0.2 nM)で5%、3.12 ng/mL (0.4 nM)で15%、6.25 ng/mL (0.8 nM)で60% (Cocchi, F. et al., 前掲)。

(4) IL-16 (分子量 12,422) : 活性型4量体40~70 ng/mL ( $\approx$  1 nM)で61%、400~700 ng/mL (=10 nM)で76%。単量体では20  $\mu$ g/mLで50% (Baier, M. et al., Nature 378;p.563(1995), Amiel, C. et al., J. Infect. Dis.:179,p.83-91(1999))。

(5) MDC (分子量 7,936) : 25 ng/mL (=3.15 nM)で20%、50 ng/mL (=6.3 nM)で50%、200 ng/mL (=25 nM)で78% (Pal, R. et al., Science 278:p.695-698(1997))。

(6) SDF-1 (分子量 8,698) : 侵入抑制率で見た場合、500 ng/mL (=57.5 nM)で30%、1  $\mu$ g/mL (=115 nM)で60%、増殖抑制率で見た場合、700  $\mu$ g/mL (=80.5 nM)で80~85% (Oberlin, E. et al., Nature 382:p.833-835(1996))。

#### 【0006】

現在、AIDS治療薬として、逆転写酵素阻害剤（プロウイルスDNAの形成を抑制する）及びプロテアーゼインヒビター（ウイルス粒子の成熟を抑制する）が実用化されるに至っている。すなわち、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤6剤、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤2剤、プロテアーゼインヒビター5剤が既に市販されており、このうち3つの薬剤（主に逆転写酵素阻害剤2剤プロテアーゼインヒビター1剤）を併用する三剤併用療法（HAART）が実施され、それにより血中のウイルスレベルを検出限界以下にすることが可能となった。

#### 【0007】

しかし、三薬剤併用療法でも、HIVを感染者の体内から完全に排除することはできない。このため、AIDS発症阻止のためには、HIV感染者はそれらの薬剤を一生服用し続けなければならない。効果を現すためにはそれらの薬剤は大量に服用しなければならない、しかも各薬剤毎に服用の間隔が厳密に定められているため、規則通りの服用が困難な場合があり、コンプライアンスが悪いことが治

療効果を減殺するという問題を生じている。更には、これらの薬剤は強い副作用を引き起こす場合が少なくない。

【0008】

一方、H I Vは非常に変異を起こしやすく、取り分け単一薬剤の投与では数ヶ月のうちに耐性ウイルスが出現する。また、一旦薬剤治療を開始した後にそれを中断すると、耐性H I Vが急速に増殖し、たとえ治療を再開しても最早その薬では効果が得られなくなる。更には、耐性H I Vは、単に何れか一薬剤に耐性であるだけでなく、作用機序を同じくする別の抗H I V剤に対しても交差耐性を獲得することが多い。従って、A I D Sの発症の抑制及び治療のためには、耐性H I Vの出現を極力回避することが必要である。そのためには、H I Vのライフサイクルにおける複数の段階を同時に抑制することが重要である。このことから、現在用いられている抗H I V剤が作用するのとは異なった段階でH I V増殖を阻害する新たな治療薬が渴望されている。この点、特に、C D 8陽性細胞の産生する液性因子は、作用機序は不確かであるがH I V増殖抑制に大きな役割を果たしていることから、新たなA I D S治療薬の候補となる可能性があるものと期待されている。

【0009】

また、A I D S治療中に強い副作用や、耐性H I Vが出現した場合には、使用する薬剤の変更が必要となるが、現在採り得る選択肢は極めて限られている。これらのことから、A I D S治療のために採り得る選択肢を広げ、且つ耐性H I Vの問題を回避するために、従来のもとは作用機序の異なったタイプの抗H I V剤が求められている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

このような状況において、本発明は、既に臨床使用されたり開発されつつあるものとは作用機序の異なった、新しいタイプの抗H I V剤を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、H I V感染者より単離したC D 8陽性細胞をH T L V - 1を用いて不死化してクローニング化し、その培養上清中の抗H I V活性を示す未知の因子を精製しその構造及び作用を調べた。その結果、該因子は、高分子量ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクティベーターのアミノ末端フラグメント（A T F : amino-terminal fragment）であることを見出した。該因子は、(1) 極めて微量（0.74 n g / m L）で抗H I V活性を示すこと、(2) マクロファージ指向性及びT細胞指向性のH I Vの何れに対しても有効であること、及び、(3) 該因子がH I Vウイルスの増殖サイクルにおいてウイルスm R N Aの翻訳より後の段階すなわちウイルス粒子のアセンブル又は出芽の段階を抑制するらしいことも見出した。また、A T Fは、細胞表面のC D 8 7に特異的に結合する性質を有するが、A T Fを分子末端に含みC D 8 7のリガンドであることの既に知られている高分子量ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクティベーター（H M W - u P A）にも同様に抗H I V活性が存在することを、健常者の尿由来ウロキナーゼを用いて見出した。更には、健常者の尿由来ウロキナーゼの分解産物として得られたA T Fも、同様の抗H I V活性を有することが確認された。更には、抗C D 8 7抗体がA T Fと類似の抗H I V作用を有すること、及びA T Fの抗H I V作用が抗C D 8 7抗体と同一の標的分子（C D 8 7）を介して行われることも見出した。これらの知見から、H I V宿主細胞表面のC D 8 7を、これと特異的に結合するA T F、H M W - u P Aやそれらの断片又は類縁体、抗C D 8 7抗体その他のリガンドと接触させてこれを封鎖することにより、H I Vの増殖を抑制できることが判明した。

## 【 0 0 1 2 】

すなわち、本発明は、C D 8 7に対するリガンドを有効成分として含むことを特徴とする、抗H I V剤を提供するものである。

## 【 0 0 1 3 】

本発明において、該リガンドは、例えば高分子量ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクティベーターであってよい。

## 【 0 0 1 4 】

また、該リガンドは、高分子量ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクティベ-

ターの、CD87に特異的な結合性を有する断片又は類縁体であってもよい。

【0015】

また、該リガンドは、高分子量ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクティベーターのアミノ末端フラグメント(ATF)であってもよい。

【0016】

また、該リガンドは、ATFの、CD87に特異的な結合性を有する断片又は類縁体であってもよい。

【0017】

また、該リガンドは、抗CD87抗体(モノクローナル又はポリクローナル)であってもよい。

【0018】

更にはまた、該リガンドは、抗CD87抗体の、CD87に特異的な結合性を有する断片又は類縁体であってもよい。

【0019】

本発明はまた、有効成分としてATF、又はCD87に特異的な結合性を有するATFの断片若しくは類縁体を含有することを特徴とする、医薬組成物をも提供する。

【0020】

本発明はまた、CD87に被検物質を接触させ、CD87に特異的に結合する物質を選択することを特徴とする、抗HIV薬のスクリーニング方法をも提供する。

【0021】

本発明はまた、CD87に被検物質を接触させてCD87に特異的に結合する被検物質を選択するステップと、選択された物質に抗HIV活性の存することを確認するステップと、抗HIV活性の存することの確認された該物質を抗HIV薬としてヒトへの投与のために製剤化するステップとを含んでなる、抗HIV剤の製造方法をも提供する。

【0022】

本発明はまた、持続的HIV感染細胞と非感染細胞の共存培養系を用意するス

テップと、該共存培養系に既知濃度の被験物質を加えて共存培養を行うステップと、該共存培養の上清中に放出されるH I V粒子量を測定するステップと、測定されたH I V粒子量を、被検物質を加えずに行ったとき共存培養の上清中に放出されるH I V粒子量と比較するステップと、該比較に基づき、H I V粒子の放出を抑制した被検物質を抗H I V薬として選択するステップを含むことを特徴とする、抗H I V薬のスクリーニング方法をも提供する。

## 【 0 0 2 3 】

本発明は更に、持続的H I V感染細胞と非感染細胞の共存培養系を用意するステップと、該共存培養系に既知濃度の被験物質を加えて共存培養を行うステップと、該共存培養の上清中に放出されるH I V粒子量を測定するステップと、測定されたH I V粒子量を、被検物質を加えずに行ったとき共存培養の上清中に放出されるH I V粒子量と比較するステップと、該比較に基づき、H I V粒子の放出を抑制した被検物質を抗H I V薬として選択するステップと、該抗H I V薬をヒトへの投与のために製剤化するステップとを含む、抗H I V剤の製造方法をも提供する。

## 【 0 0 2 4 】

## 【発明の実施の形態】

C D抗原の一つであるC D 8 7は、細胞内ドメインを持たないG P I（グリコシルホスファチジルイノシトール）アンカー型のファミリーに属する膜タンパク質であり、T細胞及び単球（マクロファージを含む）等の細胞表面に発現されている。このタンパク質は、プロウロキナーゼ及び高分子量ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクティベーターに対して高い親和性を有し、T細胞及び単球等の細胞表面でそれらのレセプターとして働いていることが知られている。ヒトC D 8 7は、先ずアミノ酸1～335よりなるプレプロ体として合成された後、シグナルペプチド部分（アミノ酸1～22）が切除され、更にそのカルボキシル末端領域アミノ酸306～335）がプロセッシングにより切除されることによって生じた新たなカルボキシル末端（305 Gly）に糖脂質（GPI）の付加修飾を受け、そのGPIを介して細胞膜に固定される。C D 8 7においてリガンドであるプロウロキナーゼ及び高分子量ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクティベーターとの結合に主たる役

割を演じているのは、そのN-末端ドメイン1（CD87のアミノ酸1～92）である（関他、生化学、71(5):350-352(1999)）。

#### 【0025】

本発明において、「CD87に対するリガンド」とは、CD87に対して特異的な結合性を有する物質を意味し、プロウロキナーゼ、高分子量ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクティベーター、ATF、抗CD87抗体やそれらの断片又は類縁体であってCD87に対し特異的な結合性を有するポリペプチド／タンパク質が代表的なものとして挙げられるが、これらに限定されず、CD87に対し特異的に結合する能力を有し且つ生体に投与可能な他の如何なる物質をも包含する。

#### 【0026】

またHIVは、サブタイプとしてはHIV-1とHIV-2とに区別できるが、HIV-1とHIV-2は共に出芽により宿主細胞から放出されるタイプのウイルスであり、相互に遺伝子的に殆ど異ならず、それらの生活環も同一で、同じメカニズムで増殖するため、抗HIV剤との関係では区別する必要がなく、実際、既存の抗HIV剤では通常区別されていない。本明細書においても、単に「HIV」というときは、「HIV-1」及び「HIV-2」を包含する。

#### 【0027】

高分子量ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクティベーター（HMW-uPA）（図1(b)、アミノ酸21～178+アミノ酸179～431）は、一本鎖のタンパク質ブレプロウロキナーゼ（sc-uPA）（図1(a)、アミノ酸1～431）が、そのN末端のシグナルペプチド（アミノ酸1～20）を失ってプロウロキナーゼとなった後、アミノ酸178とアミノ酸179との間で酵素（プラスミン、カリクレイン、カテプシンB等）による開裂を受け、ジスルフィド結合によって連結された長鎖A鎖とB鎖とに分かれることによって生じた二本鎖のタンパク質である。HMW-uPAは、各1つのEGF様ドメインと、クリングルドメイン及びウロキナーゼレセプター（CD87）結合ドメインを含んでいる。

#### 【0028】

HMW-uPAは更に、アミノ酸155とアミノ酸156との間で生体内で切断され

、低分子量ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクティベーター (LMW-uPA) (図 1 (c)、アミノ酸156~178及びアミノ酸179~431) 及びプラスミノーゲンアクティベーター活性を有しないアミノ末端フラグメント (ATF) (図 1 (d)、アミノ酸21~155) を生じる。また、アミノ酸155とアミノ酸156との間の切断は、例えば pH 8 のリン酸緩衝液中でのインキュベーションによっても生じるため、ATFの製造は、HMW-uPAを緩衝液で単にインキュベート (25~37℃) することによりATFを製造することができる。ATFは、HMW-uPAが有するEGF様ドメイン、クリングルドメイン及びウロキナーゼレセプター (CD 8 7) 結合ドメインをそのまま含んでいる。s.c-uPAをコードするヌクレオチド配列及びs.c-uPAのアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 及び 2 にそれぞれ示す。配列番号 1 又は 2 に示した各配列において、アミノ酸 1 ~ 20 がシグナルペプチドを、アミノ酸 21 ~ 431 がプロウロキナーゼを、アミノ酸 21 ~ 431 (アミノ酸 178 とアミノ酸 179 との間で開裂) が HMW-uPA を、アミノ酸 21 ~ 155 が ATF を、アミノ酸 156 ~ 431 (アミノ酸 178 とアミノ酸 179 との間で開裂) が LMW-uPA を、それぞれ表す。

#### 【 0 0 2 9 】

ヒトからヒトへの HIV 伝播は、マクロファージ指向性の HIV によって引き起こされる。感染後、時間の経過と共に、感染者の体内で T 細胞指向性の HIV が出現してくるが、これは予後不良因子と考えられている。CD 8 7 は T 細胞上にもマクロファージ上にも共通に存在しており、ATF は、HIV に感染した T 細胞及びマクロファージの何れに対しても、細胞からの HIV 放出を抑制することにより HIV 増殖抑制効果を現す。このことは、ATF が感染後の時期の如何に関わりなく抗 HIV 剤として効果を有することを意味する。また、ATF は極めて微量 (0.74 ng/mL) で効果を発揮する。従ってヒトへの投与量も従来の抗 HIV 剤より少ない量で済ませることができ、投与に伴う患者の身体に対する負担も相対的に軽くすることができる。ATF をその N 末端に含んでいる HMW-uPA も、ATF より幾分弱いものの、抗 HIV 活性を有しており、ATF と同様に使用できる。感染者に投与された HMW-uPA は、それ自身としてのみならず、体内で切断されて ATF としても抗 HIV 活性を現すと予測される。ま

た抗CD87抗体は、HIV感染T細胞に対してHIV増殖抑制作用を有するため、感染後T細胞指向性のHIVが出現た段階においてHIV増殖を抑制するのに有用である。

#### 【0030】

後述の試験結果は、本発明の抗HIV剤の一有効成分であるATFが、ウイルスの増殖サイクルにおいて、ウイルスmRNAの翻訳よりも後の段階、すなわちウイルス粒子の形成（アセンブル）又は出芽の段階において抑制作用を表すということを示しており、これは、これまで知られている抗HIV剤の作用機序とは異なる。またATFは宿主細胞の増殖にも悪影響を与えないことから、細胞毒性も認められない。従ってこれを既存の抗HIV剤と併用することにより、感染者の体内でのHIVの増殖における動的平衡状態を感染者側に有利に導くと共に、耐性ウイルスや副作用の問題の回避を容易にする、より優れたAIDS治療が可能となる。

#### 【0031】

##### <天然及び組換えATF>

本発明において、ATFは、例えば健常人尿ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクティベーターから得ることができる（Stoppelli, P.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: p. 4939-4943 (1985)を参照）。例えば、HMW-uPAを、0.2Mの塩化ナトリウムを含有する50mMリン酸緩衝液（pH8）中で約8時間又はそれ以上にわたってインキュベートし、反応産物をゲル濾過（例えば、Sephadex G-100を使用）に掛け、溶出液のUV吸収曲線に現れる最後のピーク（ピーク3：ATF）に対応する画分を先行のピーク1（HMW-uPA）及びピーク2（LMW-uPA）に対応する画分から分離することにより得ることができる。更なる精製は、ATFを含む画分をイオン交換クロマトグラフィー（例えば、50mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.8、塩化ナトリウム勾配0～1.0M、Mono S HR5/5カラム）に掛けることにより行うことができる。

#### 【0032】

ATFはまた、ATFをコードするDNAを適当な発現ベクターに組み込み、これにより適当な宿主（例えば、大腸菌、酵母及び哺乳類細胞）を形質転換する



ことにより組換えペプチドとして製造することができる。ATFは糖鎖構造を有しないことから、天然のATFをコードするcDNAを用いて作成した形質転換体が産生する組換えATFは、天然のATFと同一構造であり、従って、天然のATFと同等の活性を有することとなる。また、また、ATFやHMW-uPAの断片又は類縁体でCD87に対し特異的な結合能力を有するペプチドは、例えばATFやHMW-uPAの部分的修飾、例えば末端アミノ酸残基の削除又は末端へのアミノ酸残基付加、化学的性質の類似したアミノ酸による置換等により行うことができる。それらの操作は化学的に行ってもよいが、ATFやウロキナーゼ型プラスミノゲンアクティベーターをコードするcDNAに対して、周知の何れかの手段を用いて変異を導入することによって行うのが極めて容易である。

#### 【0033】

##### ＜リガンドのスクリーニング方法＞

CD87に被検物質を接触させ、CD87に特異的に結合する物質を選択することを特徴とする本発明の抗HIV薬のスクリーニング方法は、CD87を表面上に有する細胞（T細胞株、マクロファージ細胞株）を用いて行うことができる。また、CD87への被検物質の特異的結合の検出は、レセプター分子へのリガンドの特異的結合の検出のために当業者に知られた種々の手段をCD87に適用することによって、任意の方法で適宜行うことができる。例えば、被検物質を組み換え技術を用いて作成したCD87と混和し、インキュベートした後に、抗CD87抗体で免疫沈澱させ、共沈される物質の有無により、特異的な結合を確認することができる。

#### 【0034】

また、本発明の別のスクリーニング方法である、持続的HIV感染細胞と非感染細胞の共存培養系を用意するステップと、該共存培養系に既知濃度の被験物質を加えて共存培養を行うステップと、該共存培養の上清中に放出されるHIV粒子量を測定するステップと、測定されたHIV粒子量を、被検物質を加えずに行ったとき共存培養の上清中に放出されるHIV粒子量と比較するステップと、該比較に基づき、HIV粒子の放出を抑制した被検物質を抗HIV薬として選択するステップを含むことを特徴とする、抗HIV薬のスクリーニング方法は、例え

ば後述の実施例を参照して行うことができる。使用する細胞及び培養上清中のH I V粒子量の測定方法の選択においては実施例に拘束される必要はなく、目的に適う材料及び方法を当業者は適宜選択できる。

#### 【0035】

本発明の抗H I V剤は、注射、埋込み等の非経口的方法で、又は、経鼻、経肺等の方法でH I V感染者に投与することができる。本発明の抗H I V剤を注射剤の形態とする場合、例えば静脈内、腹腔内、筋肉内及び皮下注射用剤とすることができる。注射のためには、本発明の抗H I V剤は、無菌の水性又は非水性の溶液、懸濁液及び乳濁液の形態をとってよい。水性の媒質としては、水又は、薬剤学的に許容し得る不活性な溶質例えば塩類、多糖類若しくは多価アルコール等を含む水溶液が挙げられ、それらはまた、薬剤学的に許容し得る緩衝剤により所定のp H範囲に緩衝されていてよい。そのような水性媒質の例としては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルブドウ糖液、ブドウ糖液、乳酸リンゲル液等が挙げられるが、それらに限定されない。また、製剤の貯蔵安定性を高めるためには、製剤を凍結乾燥粉末とすることができる。

#### 【0036】

注射用の製剤のための非水性の媒質としては、グリセロールやプロピレングリコール等の多価アルコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えばオリーブ油、ダイズ油、ナタネ油等）、及びオレイン酸エチル等のような有機エステルその他、非経口投与のために通常用いられる非水性の媒質を適宜用いることができる。

#### 【0037】

本発明の抗H I V剤を埋込み用の製剤とする場合、A T F等のC D 8 7のリガンドの持続的な放出を可能にする徐放性担体を適宜用いることができる。そのような担体の使用は、リガンドの投与頻度の減少及び／又は投与量の低下、取扱の容易さ、及びより大きな又はより長期間の効果をもたらすため好ましい。そのような担体の例としては、リポソーム、マイクロスフェア、又は天然又は合成のポリマーよりなるマイクロカプセルその他が挙げられるが、それらに限定されない。また殆どの環境において持続的な遅延された放出のために適した担体の例とし

て、ゼラチン、アラビアゴム、キサンタンポリマー、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸／グリコール酸コポリマー等が挙げられる。

#### 【0038】

経鼻投与及び経肺投与（吸入）は、投薬に伴う患者の負担を軽減するのに特に有効な投与経路である。経鼻投与及び経肺投与（吸入）のためには、本発明の抗HIV剤は、溶液、粉末その他、微細な粒子として噴霧及び吸入するのに適した製剤形態とすればよい。そのような製剤の例としては、ATF等のCD87のリガンドと担体との混合物とからなる直径 $10\mu\text{m}$ 以下の乾燥粉末が挙げられる。担体としては、例えばブドウ糖、果糖その他の単糖類、乳糖、麦芽糖、ショ糖その他二糖類、デンプン、セルロース、ヒアルロン酸、キチン、キトサンその他の多糖類、ソルビトール、マンニトールその他の糖アルコール等、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース等のセルロース誘導体やポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールその他の有機結合剤、非イオン界面活性剤、ゼラチン、カゼインその他のタンパク質、ポリエチレングリコール等の合成ポリマー等を用いることができる。また、経鼻投与及び経肺投与のための製剤の別の例としては、乾燥ATF等のCD87のリガンドの粉末を弗化炭素プロペラント中に懸濁させたものが挙げられる。

#### 【0039】

本発明において抗HIV剤の有効成分の感染者体重あたり投与量は、ATFの場合 $10\mu\text{g}\sim 10\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 、HMW-uPAの場合 $10\mu\text{g}\sim 10\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 、抗CD87抗体の場合 $10\mu\text{g}\sim 10\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 程度が適当である。

#### 【0040】

##### 【実施例】

以下実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明が実施例に限定されることは意図しない。

ATFの精製、同定、並びにATF、HMW-uPA及び抗CD87抗体の抗HIV活性測定に用いた材料及び方法を以下に述べる。

【 0 0 4 1 】

<材料>

1) プラスミド

(i) pNL4-3: NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, catalog No. 114として寄託されているものを入手して用いた(図5を参照)。これはHIV-1感染者のゲノムより単離されたT細胞指向性HIV-1プロウイルスゲノムDNAをプラスミドベクターpUC18に組み込んだものであり(Adachi, A. et al., J. Virol., 59(2):284-291(1986))、これで細胞をトランスフェクトスフェクトすることにより、細胞に感染性HIV-1ウイルスを産生させることができる。

(ii) pSBR-HIV: pSEAP-Basic (CLONTECH, Palo Alto, CA, USA) を基本骨格として、レポーター遺伝子である分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)遺伝子の5'上流に、プロモーターとしてpNL4-3のLTR領域を組み込み、更にハイグロマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとして導入したもの。

このプラスミドは、次の工程により製造した。すなわち:

(a) pSEAP-Basic (図2) (CLONTECH) をNotIとSalIで消化し、SEAP遺伝子を含む領域(図2中、円弧で示した領域)を取り出し、NotI部位をT4ポリメラーゼで平滑化した。

(b) 別に、pREP7 (図3) (INVITROGEN, 9704CH, Groningen, the Netherlands) をSalIとClaIで消化し、ハイグロマイシン耐性遺伝子(Hygromycin)とColEIとアンピシリン耐性遺伝子(Amp)を含む領域(図3中、円弧で示した領域)を取り出し、ClaI部位をT4ポリメラーゼで平滑化した。

(c) 上記(a)及び(b)で得られたプラスミド断片をライゲーションすることにより、pSBR (図4) を構築した。

(d) pNL4-3から、XhoI部位又はHindIII部位を付加したプライマーを用いてPCR法によりHIV-LTRを増幅し(図5)、増幅産物をXhoI及びHindIIIで消化した。

(e) 上記(c)で得たpSBRをXhoI及びHindIIIで消化し、これに、上記(d)で得られたHIV-LTRを挿入してpSBR-HIV (図6) を構築した。

なお、pSBR-HIVは、HIV-LTRをプロモーターとして持ちレポーター遺伝子（実施例ではSEAP）を発現するプラスミドの一例として構築したものであり、HIV-LTRをプロモーターとして持ち適宜のレポーター遺伝子を発現する、任意のプラスミドを構築して同様に使用してもよい。

【 0 0 4 2 】

## 2) 細胞

(i) HUT.78: NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, catalog No. 89として寄託されているものを用いた。これは慢性皮膚性リンパ腫セザリ-症候群患者の末梢血から確立されたCD4陽性T細胞株である。この細胞は、10%FCS（ウシ胎仔血清）を含むRPMI1640培地（Gibco/BRL）で培養した。

(ii) U937: ATCC (American Type Culture Collection) に catalog No. CRL-1593.2として、及び国立衛生試験所細胞バンクにJCRB, catalog No. 9021として寄託されているものを用いた。これは組織球性リンパ腫患者の腹水から確立されたCD4陽性単芽球株である。この細胞は、10%FCSを含むRPMI1640培地で培養した。

(iii) TALL-1: 国立衛生試験所細胞バンクにJCRB catalog No. 0086として寄託されているものを入手した。これは急性リンパ性白血病患者の末梢血から確立されたCD4陽性T細胞株である。この細胞は、10%FCSを含むRPMI1640培地で培養した。

(iv) T4/NL4-3: TALL-1にpNL4-3をトランスフェクトすることにより作成した。これは持続的HIV-1感染細胞である。この細胞は、10%FCS及び5  $\mu$ M AZTを含むRPMI1640培地で培養した。

(v) U1: NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, catalog No. 165として寄託されているものを入手した。これはU937にHIV-1感染者末梢血由来HIV-1臨床株を感染させ樹立されたマクロファージ指向性HIV-1持続感染株である（Chen, B.K., et al., J. Virol., 68(2):654-660(1994)）。この細胞は、10%FCS及び5  $\mu$ M AZTを含むRPMI1640培地で培養した。

(vi) MC141: HUT.78細胞にpSBR-HIVをトランスフェクトすることによりHIV-LTR-SEAPレポーター遺伝子を導入することにより作成した。これは安定的SEAP

発現トランスフェクト体である。この細胞は、10%FCS及びハイグロマイシン300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含むRPMI1640培地で培養した。

(vii) CL-35: U937にpSBR-HIVをトランスフェクトすることによりHIV-LTR-SEAPレポーター遺伝子を導入して得た安定的SEAP発現トランスフェクト体である。この細胞は、10%FCS及びハイグロマイシン300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含むRPMI1640培地で培養した。

(viii) クローン #62: 日本人長期無症候HIV-1感染者末梢血由来CD8陽性T細胞を抗CD8抗体でコートした磁性ビーズを用いた正の選択により単離し、これにMT-2 HTLV-1産生T細胞株(1000 rad照射)の同数を接触させることにより感染させて不死化し、1ヶ月間培養の後、限界希釈法によりクローニングして得た。このクローンの培養上清は強いSHIF(可溶性HIV増殖抑制因子)活性を示す。この細胞は、15%FCS、IL-2 10単位/mL、10%PBMC(ヒト末梢血由来単核球)条件培養液を含む、RPMI1640培地で継代した。

(ix) PBMC: 献血由来バフィーコートよりFicoll-Paque (Amersham Pharmacia)を用いて精製した。これは、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のPHA、1単位/mLのIL-2及び10%FCSを含むRPMI1640培地で3日間培養した後、PHAを含まない同じ培地に交換して更に6日間培養したものを、条件培養液として使用した。

#### 【0043】

##### <CD8陽性クローン培養上清の調製>

RPMI1640培地で継代維持しているクローン #62を、5%FCS及び10単位/mLのIL-2を含むPM1000培地(栄研化学)に培地交換し、3~4日間培養した。1/2量の培養上清を回収し、細胞には等量の培地を新たに加えて連続的に培養を続けた。回収した培養上清は、0.22  $\mu\text{m}$ のフィルターに通して沈殿物を除き、-80°Cで保存した。

#### 【0044】

##### <抗HIV活性測定>

###### 1) 共存培養アッセイ:

共存培養アッセイにおいては、HIV持続感染細胞株と非感染細胞株との混合培養が行われる。それにより、非感染細胞へのウイルス吸着、感染、感染細胞内

でのウイルス増殖及びウイルス粒子放出の全ての段階からなるウイルスのライフサイクルを含んだ試験系が得られる。このため、共存培養において、細胞外に放出されるウイルス量を測定し、被検物質の添加の有無で放出ウイルス量を比較することにより、ウイルスのライフサイクル中の何れかの段階に対する被検物質の抗ウイルス活性を検出することができる。また、H I V 持続感染細胞株と非感染細胞株の組み合わせとして、T細胞株同志の組み合わせ（HUT.78及びT4/NL4-3）並びにマクロファージ株同志の組み合わせ（U1及びU937）を用いることにより、T細胞指向性H I V 及びマクロファージ指向性H I V の各々に対し、被検物質の抗H I V 活性を評価することができる。

試験操作： 48穴プレートにPM1000培地で希釈したサンプル300  $\mu$  L と 6 n g / m L のTNF  $\alpha$  及び20%FCSを含むRPMI1640培地100  $\mu$  L を加えておき、そこにOPT I-MEM I 培地で  $2 \times 10^5$  個 / m L に調製したHUT.78細胞100  $\mu$  L と、RPMI1640培地で  $5 \times 10^4$  個 / m L に懸濁したT4/NL4-3細胞100  $\mu$  L を加え（感染T4/NL4-3：未感染HUT.78 = 1 : 4）、3日間培養した。3日後、培養上清の1/2量を同濃度のサンプルを含む新鮮な培地と交換し、更に3日間培養した。培養6日後の培養上清を回収し、培養上清中のウイルス量（p17）とHIV-LTR転写量（SEAP）を測定した。測定には、HIVp17抗原ELISAキット（栄研化学）及び、SEAP レポーター・ジーン・アッセイ化学ルミネセント（ROCHE）を、添付の説明書に従って使用した。6日間培養した細胞には、50  $\mu$  L のMTSアッセイ試薬（水溶性テトラゾリウム塩）（PROMEGA）を加え、更に4時間培養後、発色をOD490 n m で測定し、その時点での生細胞数とした。

同様の方法で、U1（持続感染株）及びU937（非感染株）の共存培養系（U1 : U937 = 1 : 4）についても試験を行った。

【 0 0 4 5 】

## 2) 持続感染細胞単独培養アッセイ：

A T F の抗H I V 活性がH I V のライフサイクルのどの段階を抑制することによるものかについての知見を得るため、持続感染細胞であるU1細胞の単独培養におけるA T F の抗H I V 活性の有無を検討した。U1細胞はH I V の重複感染を起こさないことが知られていることから、U1細胞の単独培養において抗H I V 活性

が認められた場合、それはH I VプロウイルスDNAの転写ないしそれ以降の段階に対してA T Fが作用したことを示す証拠となる。

試験操作： 48穴プレートにPM1000培地で希釈したサンプル300  $\mu$  Lと、6 n g / m L のTNF  $\alpha$  及び15%FCSを含むRPMI1640培地200  $\mu$  Lを加えておき、そこにOPT I-MEM I 培地で $2 \times 10^5$ 個 / m Lに調製した持続感染細胞 (U1) 100  $\mu$  Lを加え、3日間培養した。3日後、培養上清の1/2量を同濃度のサンプルを含む新鮮な培地と交換し、更に3日間培養した。培養6日後の培養上清を回収し、培養上清中のウイルス量 (p17) を測定した。

【0046】

### 3) 感染性H I V-DNA一過性トランスフェクション：

感染性H I V-DNAをリポソームを用いて強制的に細胞内に導入することにより、ウイルスDNAの核への移行の段階までを強制的に行わせることができる。この系を用いることにより、宿主細胞へのH I V侵入段階より後のH I Vライフサイクルに対する被検物質の抑制作用の有無を検討することができる。

試験操作： 感染性H I V-1 DNA (pNL4-3) 4  $\mu$  gとDMRIE-C試薬 (GIBCO / BRL) 10  $\mu$  Lを混和し、 $2 \times 10^6$ 個のMC141細胞にトランスフェクトした。24時間後、細胞を回収し、OPTI-MEM I 培地で $2 \times 10^5$ 個 / m Lに調製した。48穴プレートにPM1000培地で希釈したサンプル300  $\mu$  Lと、6 n g / m L のTNF  $\alpha$  及び15%FCSを含むRPMI1640培地200  $\mu$  Lを加えておき、そこにトランスフェクトしたMC141細胞 ( $2 \times 10^5$  / m L) を100  $\mu$  L加え、3日間培養した。3日後、培養上清の1/2量を同濃度のサンプルを含む新鮮な培地と交換し、更に4日間培養した。トランスフェクトから8日後、培養上清を回収し、培養上清中のウイルス量 (p17) とHIV-LTR転写量 (SEAP) を測定した。

【0047】

### 4) 非感染細胞におけるSEAPレポーターアッセイ：

HIV-LTR-SEAPレポーター遺伝子を導入したH I V非感染細胞 (MC141細胞及びC L35細胞) において、TNF  $\alpha$  刺激は、H I VのプロモーターL T Rを活性化させその下流に組み込まれた分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 遺伝子を発現させる。従ってこれらの細胞は、H I Vのライフサイクルの各段階のうち、H I V



プロウイルス転写の段階に対して被検物質が阻害活性を有するか否かを、実際のHIV増殖を伴うことなく調べるのために用いられる。HIV-LTRの転写活性の強さの測定は、培養上清中のSEAPを定量することにより行われる。

試験操作： 96穴プレートに、血清を含まないPM1000培地で希釈したサンプル50  $\mu$ Lと、6 ng/mLのTNF $\alpha$ 及び20%FCSを含むRPMI1640培地25  $\mu$ Lを加えておき、そこにOPTI-MEM I 培地 (GIBCO/BRL) で  $2 \times 10^5$ /mLに調整したMC141細胞又はCL35細胞25  $\mu$ Lを播いた。細胞をATF添加又は無添加の下にそれぞれ培養し、培養6日後の培養上清を回収し、そこに含まれるSEAP量を、SEAP レポーター・ジーン・アッセイ化学ルミネセント (ROCHE) を用いて測定した。

【0048】

5) 急性感染HIV増殖抑制活性測定 (トランスフェクションアッセイ) :

感染性HIV-1 DNA (pNL4-3) 4  $\mu$ gとDMRIE-C試薬 (GIBCO/BRL) 10  $\mu$ Lを混和し  $2 \times 10^6$ 個のHUT.78細胞にトランスフェクトした。24時間後、細胞を回収し、OPTI-MEM I 培地で洗浄後、  $2 \times 10^5$ 個/mLに調製した。48穴プレートに、段階希釈したサンプル又は緩衝液を含むPM1000培地300  $\mu$ Lと、6 ng/mLのTNF $\alpha$ 及び15%FCSを含むRPMI1640培地200  $\mu$ Lを加えておき、そこにトランスフェクトしたHUT.78細胞 ( $2 \times 10^5$ 個/mL) を100  $\mu$ L加え、4日間培養した。4日後、培地の1/2量を回収し、同濃度のサンプル又は緩衝液を含む新鮮な培地と交換した。以後、4日毎にサンプリングと1/2量の培地交換とを行い、感染から12日後まで培養した。

アッセイはn=2で行い、各培養上清中のウイルス量は、HIVp17抗原ELISAキット (栄研化学) を用いて測定した。

【0049】

6) ATFの抗HIV活性に対する抗CD87抗体の影響の検討 :

ATF及びHMW-uPAは細胞表面状のCD87に特異的に結合することが知られていることから。ATF及びHMW-uPAの何れにも認められた抗HIV活性は、CD87への結合を介したものであると推定された。これを確認するため、抗CD87抗体がATFの抗HIV活性を遮断し得るか否かを検討した。

試験操作： 48穴プレートにPM1000培地で希釈した抗CD87モノクローナル抗体 (

#3936 : AMERICAN DIAGNOSTICA INC.)  $300 \mu\text{L}$ と、 $6 \text{ ng/mL}$ の $\text{TNF}\alpha$ 及び20%FCSを含むRPMI1640培地 $100 \mu\text{L}$ を加えておき、そこにOPTI-MEM I 培地で $2 \times 10^5$ 個/ $\text{mL}$ に調製したMC141細胞 $100 \mu\text{L}$ と、RPMI1640培地で $5 \times 10^4$ 個/ $\text{mL}$ に懸濁したT4/NL4-3細胞 $100 \mu\text{L}$ を加え、2時間培養した(抗体の最終濃度は $10 \mu\text{g/mL}$ )。2時間後、ATFを含むサンプル $12 \mu\text{L}$ (ATFの最終濃度は約 $3.3 \text{ ng/mL}$ )を加えた。3日間培養した後、培養上清の1/2量を同濃度の抗体及びサンプルを含む新鮮な培地と交換し、更に3日間培養した。培養6日後の培養上清を回収し、培養上清中のウイルス量(p17)を測定した。また、対照として、抗体及びATFの一方又は双方を含まない培地、及び抗CD87抗体の代わりに非特異的なIgGを添加した培地を用いた培養を、同様の手順で行った。

同様の方法で、感染U1 : 未感染CL35 = 1 : 4の共存培養系についても試験を行った。

【0050】

#### <抗HIV活性因子の調製>

以下の精製操作は、特に断らない限り、全て $4^\circ\text{C}$ にて行った。

1) 先ず、培養上清に1N塩酸を加えpH2.5に調整し、 $4^\circ\text{C}$ にて24時間処理した。この処理により、潜在的なウイルス感染のリスクを排除するとともに、多量に含まれるインターフェロン $\gamma$ を失活させた。次いで、1N水酸化ナトリウムを加えpH3.8に調整した。pH処理を行った培養上清500mLを、50mMの塩化ナトリウムを含有する25mM酢酸緩衝液(pH3.8)で平衡化したSPセファローズHigh Performance (AMERSHAM PHARMACIA) カラム(26mm $\times$ 10cm)に添加した。同緩衝液175mLで洗った後、50mMのHEPES/NaOH(pH7.4)緩衝液175mLで溶出し(E1)、更に250mMの塩化ナトリウムを含有する50mMのHEPES/NaOH(pH7.4)緩衝液175mLで溶出した(E2)。各画分につき、NAP-5カラムで緩衝液交換した後、濃度50%で抗HIV活性を測定した。

【0051】

2) 活性は、SPセファローズHigh PerformanceカラムのE2画分に回収された。2ロット分のE2画分(1Lの培養上清に相当)に塩化ナトリウムを加え最終濃度500mMに調製した。これを、500mMの塩化ナトリウムを含有する50mM

のHEPES/NaOH (pH7.4) 緩衝液で平衡化したBlue Sepharose 6FF (AMERSHAM PHARMACIA) カラム (26mm×10cm) に添加した。同緩衝液175mLで洗った後、1.8Mの塩化ナトリウムと0.1%のCHAPSを含有する50mMのHEPES/NaOH (pH7.4) 緩衝液200mLで溶出した (E1)。NAP-5カラムで緩衝液交換を行った後、濃度33%で抗HIV活性を測定した。

## 【 0 0 5 2 】

3) 活性は、Blue Sepharose 6FF のE1画分に回収された。これを1.8Mの塩化ナトリウムと0.1%のCHAPSを含有する50mMのHEPES/NaOH (pH7.4) 緩衝液で平衡化したHiPrep Butyl 4FF (AMERSHAM PHARMACIA) カラム (16mm×10cm) に添加した (P)。同緩衝液50mLで洗った後 (W)、100mLの0.1%CHAPS/水で溶出した (E)。NAP-5カラムで緩衝液交換を行った後、濃度33%で抗HIV活性を測定した。

## 【 0 0 5 3 】

4) 活性はButyl Sepharoseの非吸着画分 (P及びW) に回収された。3ロット分の非吸着画分 (3Lの培養上清に相当) に塩化ナトリウムを加えて最終濃度2Mに調整した。これを、2Mの塩化ナトリウムと0.1%のCHAPSを含有する50mM HEPES/NaOH (pH7.4) 緩衝液で平衡化したHiPrep Phenyl (HighSub) 6FF (AMERSHAM PHARMACIA) カラム (16mm×10cm) に添加した。同緩衝液175mLで洗った後、250mMの塩化ナトリウムと0.1%のCHAPSを含有する50mMのHEPES/NaOH (pH7.4) 緩衝液150mLで溶出し (E1)、更に0.1%CHAPS/水の100mLで溶出した (E2)。NAP-5カラムで緩衝液交換を行った後、濃度25%で抗HIV活性を測定した。

## 【 0 0 5 4 】

5) 活性はE1画分に回収された。これを、0.1%のCHAPSを含有する10mMリン酸ナトリウム (pH7.3) 緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイト (CHT-2、20μm; BioRad) カラム (10mm×10cm) に添加した。同緩衝液50mLで洗った後 (W)、0.1%のCHAPSを含有する200mMリン酸ナトリウム (pH7.3) で溶出した (E200)。NAP-5カラムで緩衝液交換を行った後、濃度25%で抗HIV活性を測定した。

【 0 0 5 5 】

6) 活性はヒドロキシアパタイトの非吸着画分 (P) に回収された。これを CentriPlus-10 (分子量10,000カット) 限外濾過膜 (AMICON MILLIPORE) を用いて約40倍に濃縮した。濃縮した活性画分 (3.75mL) を、0.1%のCHAPSと5%のグリセロールを含有する10mMリン酸ナトリウム (pH6.4) 緩衝液で平衡化したHiPrep Sephacryl S-100 HR (AMERSHAM PHARMACIA) カラム (16mm×60cm) に添加した。同緩衝液144mLで溶出し、2.5mLずつ分取した。NAP-5カラムで緩衝液交換を行った後、濃度12.5%で抗HIVを測定した。

【 0 0 5 6 】

7) 活性を有する画分を回収し、0.1%のCHAPSを含有する10mMリン酸ナトリウム (pH6.4) 緩衝液で2倍希釈した後、同緩衝液で平衡化したResource S (AMERSHAM PHARMACIA) カラム (0.64×3cm) に添加した。同緩衝液10mLで洗った後、0.1%のCHAPSを含有する10mMリン酸ナトリウム (pH6.4) 緩衝液を用い、0から500mMまでの塩化ナトリウムグラジエントで溶出し (全25mL)、1mLずつ分取した。抗HIV活性は濃度2.5%で測定した。

【 0 0 5 7 】

8) 活性を有する画分を回収し、3ロット分のResource S活性画分 (9Lの培養上清に相当) を、0.1%のCHAPSを含有する10mMリン酸カリウム (pH6.35) 緩衝液で2.5倍に希釈した後、同緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイト (C HT-2, 20μm; BioRad) カラム (0.5×5cm) に添加した。同緩衝液5mLで洗った後、0.1%のCHAPSを含有する、10mMから400mMまでのリン酸カリウム (pH6.35) のグラジエントで溶出し (全25mL)、0.5mLずつ分取した。抗HIV活性は濃度1%で測定した。各画分について抗ウイルス活性の測定は、HIV持続感染株と非感染株の1:4の割合の共存培養系で培養上清中に放出されるp17抗原を指標とするELISAにより行った。

アッセイ時のサンプル濃度が5%以上になる場合は、血清を含まないPM1000培地で平衡化したNAP-5カラム (AMERSHAM PHARMACIA) を用いてサンプルを同培地に緩衝液交換し、クロマトグラフィーから持ち込まれる過剰の塩等が影響しないようにした。サンプル濃度が5%以下になる場合は、サンプルを直接添加する一

方、クロマトグラフィーの際にブランクランを行い、その各画分を対照とすることを持ち込まれる塩の影響を排除した。

結果を図 7 及び 8 に示す。図 7 において、黒四角は測定した画分の抗ウイルス活性を、破線は溶出液の UV 吸収曲線を、そして右上がりの直線は、各画分に対応するリン酸カリウム濃度を、それぞれ示す。図 8 は、画分 No. 8 ~ No. 19 についての SDS/PAGE (還元性条件) 泳動像を示す。図 7 と図 8 とから分かるように、p17 放出の抑制でみた抗 HIV 活性画分に対応して分子量約 18 k D a のバンドが確認された。

#### 【 0 0 5 8 】

9) 活性を有する画分を回収し、Centricon-10 (分子量 10,000 カット) 限外濾過膜 (MILLIPORE) を用いて 15 倍に濃縮した。2 ロット分の濃縮したヒドロキシアパタイト活性画分 (18 L の培養上清に相当) に最終濃度 0.2% のトリフルオロ酢酸 (TFA) を加え、0.2% トリフルオロ酢酸 / 水で平衡化した Resource RPC (AMERSHAM PHARMACIA) カラム (0.64 × 3 c m) に添加した。同緩衝液 5 m L で洗った後、0.2% TFA、30% アセトニトリルまで 5 m L、0.2% TFA、50% アセトニトリルまで 15 m L、0.2% TFA、100% アセトニトリルまで 5 m L のグラジエントで溶出し、0.5 m L ずつ分取した。この逆相カラムクロマトグラフィーのに 10℃ にて行った。抗 HIV 活性は濃度 0.2% で測定した。その結果、この Resource RPC カラムからの溶出液においても、抗 HIV 活性を示す画分に対応して 18 k D a のバンドが SDS/PAGE により確認された。

#### 【 0 0 5 9 】

活性な画分を回収して減圧乾燥し、約 0.9 μ g (500 p m o l) の 18 k D a タンパク質を得た。活性測定用には、これを、0.5% BSA と 0.1% CHAPS を含むリン酸緩衝液 (PBS) に溶解した。また配列決定用には、SDS/PAGE サンプル緩衝液に溶解した。

#### 【 0 0 6 0 】

##### < アミノ酸配列決定 >

上記で精製された 18 k D a タンパク質サンプルを SDS/PAGE に供し、クマジー・ブリリアント・ブルー (CBB) 染色後、バンドを切り出した。切り出したゲル片

を直接トリプシン消化し、ペプチドマッピングを行った。また得られたピークのうち3つのアミノ酸配列をシーケンサーにより決定した。その結果、次の内部配列の存在が確認された。

- ・ 配列表の配列番号3に示すアミノ酸配列（断片1）。
- ・ 配列表の配列番号4に示すアミノ酸配列（断片2）。
- ・ 配列表の配列番号5に示すアミノ酸配列（断片3）。

#### 【 0 0 6 1 】

これら断片1、2及び3のアミノ酸配列は、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクティベーター（uPA）のアミノ末端断片（Amino Terminal Fragment（ATF）又はLong A chainと呼ばれる）の配列と一致した。ペプチドマッピング及びアミノ酸配列決定結果より、上記で精製されたタンパク質がATFであることが判明した。

#### 【 0 0 6 2 】

#### <ウロキナーゼ原体からのATFの精製>

活性画分には一本鎖ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクティベーター、HMW-uPA、LMW-uPAの何れに対応するバンドも認められなかったことから、ATFが抗HIV活性を有することが上記により強く示唆された。そこで本発明らは、以下に述べるように、ヒト尿由来ウロキナーゼ原体からATFを得、その抗HIV活性を評価した。

#### 【 0 0 6 3 】

日本ケミカルリサーチ株式会社西神工場で製造したヒト尿由来ウロキナーゼ原体（JUN-9604）4.5mL（約50000単位のウロキナーゼを含有）を、0.1%のCHAPSと100mMの塩化ナトリウムを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.4）で平衡化したHiPrep Sephacryl S-100カラム（16mm×60cm）に添加した。同緩衝液144mLで溶出し、2.5mLずつ分取した。活性は、濃度1%で測定した。

#### 【 0 0 6 4 】

分析の結果、上記ウロキナーゼ原体には、HMW-uPA、LMW-uPA及びATFが、およそ9：1：1の割合で含まれていることが判明した。HiPrep Sephacryl S-100カラムを通して得られた画分において、ATFのみを含む画分（

No. 27～No. 33) に強い抗HIV活性 (p17放出抑制) が確認された (図9及び10を参照)。このことは、クローン #62培養上清から精製された可溶性HIV増殖抑制因子についての前記試験から予測された通り、ATFが抗HIV活性を有することを示している。

#### 【0065】

ATFの抗HIV活性に加えて、HMW-uPAを含有する画分 (No. 15～No. 18) にも、ATFに比して弱いながらも、やはり抗HIV活性 (p17) があることが見出された (図9及び10を参照)。

#### 【0066】

#### <共存培養系におけるATFの抗HIV活性測定結果>

精製したATFは、T細胞株及びマクロファージ株の何れの共存培養系においても、濃度依存的に培養上清中のp17量を抑制し、濃度1.5 ng/mLでの抑制率は約40%であった (図11、12)。また、ATFの添加によっても培養細胞の増殖率は対照に比して変化しなかった (図11、12) ことから、ATFが細胞の増殖に影響せず毒性のないことも判明した。これらのことは、ATFが示す抗HIV活性が細胞毒性によるものでないこと、ATFが非常に低濃度で抗HIV活性を表すこと、及び該抗HIV活性がT細胞指向性及びマクロファージ指向性の何れのHIVに対しても実質的に同等の強さであることを示している。

#### 【0067】

#### <非感染細胞培養におけるSEAPレポーターアッセイ結果>

図13及び14を参照。MC141及びCL35の単独培養でのSEAPレポーターアッセイでは、ATFは、何れの細胞についても培養上清中のアルカリホスファターゼ量に影響を及ぼさなかった (図13及び14)。このことは、ATFが、HIV-LTRからの転写やそれに続く翻訳の段階でHIVの増殖を抑制しているのではないことを示している。またこの条件でも、ATFは細胞の増殖率に影響を及ぼさなかった (図13及び14)。

#### 【0068】

#### <感染性HIV-DNA一過性トランスフェクションアッセイ結果>

図15を参照。感染性HIV-DNA (pNL4-3) により一過性トランスフェク

ションしたMC141細胞を用いたアッセイにおいても、1.5 n g / m L の A T F は、培養上清中への H I V の p17 の放出を約60%抑制した。しかしながら、SEAP発現量、すなわち L T R 転写活性には影響しなかった。また細胞の増殖率にも影響を及ぼさなかった。

L T R からの転写量が A T F によって影響を受けなかった一方で p17 の放出が抑制されたことは、A T F の抗 H I V 活性が、H I V - L T R からの転写、H I V t a t による転写の増強、又はそれに続く翻訳の何れの段階の抑制によるものでもないことを示すと共に、翻訳より後の段階すなわち H I V 粒子形成又はその出芽の段階の抑制によるものであることを示唆している。

【 0 0 6 9 】

#### <持続感染細胞単独培養アッセイ結果>

図 1 6 を参照。持続感染細胞 (U1) の単独培養において培養上清中へのウイルス抗原 p17 の放出量は、A T F 1.5 n g / m L で約50%抑制された。しかしながら、細胞内の p17 量に対しては A T F は影響を及ぼさなかった。また、A T F は細胞の増殖率に影響を及ぼさなかった。

U1細胞は H I V の重複感染を起こさないことが知られていることから、U1細胞の単独培養において検出される抗 H I V 活性は、プロウイルス D N A の転写以降の段階に対するものに限定される。従って、U1細胞単独培養で A T F がウイルス粒子 (p17) 放出を抑制したことは、A T F が H I V のプロウイルス D N A の転写以降の段階を抑制していることを示している。一方、A T F は、細胞内の p17 量にも影響を及ぼしていないことから、H I V のプロウイルス D N A の転写から H I V m R N A の翻訳までの段階を抑制するものでもないこと明らかである。この持続感染細胞単独培養アッセイと同じ結果は、前記一過性トランスフェクションアッセイによっても得られており、これらのことは、A T F が、H I V m R N A の翻訳よりも後の段階、すなわちウイルス粒子の形成からウイルス粒子の出芽に至る段階を抑制するものであることを強く示唆している。

【 0 0 7 0 】

#### <急性感染 H I V 増殖抑制活性測定 (トランスフェクションアッセイ) >

培養開始後の日数経過に伴うウイルス量の変化を示す図 1 7 を参照。図より、



対照群では、ウイルス量は培養開始後 8 日～12 日の間に急激に増加することが判る。使用した緩衝液の影響は殆ど認められなかった。一方、A T F 添加群では、ウイルスの増殖速度は顕著に低下し、ウイルス増殖抑制効果は、A T F 濃度に依存的であった。更に、ウイルス増殖抑制率は培養日数の経過につれて増強され（図 1 8 を参照）、感染から 12 日後の時点においては、A T F 濃度  $0.74 \text{ ng/mL}$  で 75% 以上、 $2.22 \text{ ng/mL}$  では 87% 以上の抑制率が得られた。

【 0 0 7 1 】

#### < A T F の抗 H I V 活性に対する抗 CD 8 7 抗体の影響 >

図 1 9 を参照。T 細胞株である T4/NL4-3 細胞及び MC141 細胞の共存培養系において培養上清中への p17 の放出は、A T F や HMW-u P A のレセプターである CD 8 7 に対するモノクローナル抗体  $10 \mu \text{g/mL}$  と A T F  $3.3 \text{ ng/mL}$  の双方を含んだ培地を用いたときと、A T F  $3.3 \text{ ng/mL}$  のみを含んだ培地を用いたときとで、ほぼ同程度に抑制されていた。一方、抗 CD 8 7 抗体は、それ自身抗体  $10 \mu \text{g/mL}$  の濃度で A T F  $3.3 \text{ ng/mL}$  とほぼ同程度の抗 H I V 活性を有していることが見出された。抗 CD 8 7 抗体と A T F の何れか片方又は双方を含有する培地での培養による p17 放出抑制の程度が相互にほぼ同等であることから、A T F と抗 CD 8 7 抗体とは、細胞表面上の同一の標的分子を介して作用しているものと考えられる。一方、抗 CD 8 7 抗体の代わりに非特異的 IgG を用いた培養での結果は、何らの抗体をも含有しない培養での結果と変わるところがなかった。このことは抗 CD 8 7 が示した抗 H I V 活性が、該抗体の特異性に依存することを示すものである。従って細胞表面上の CD 8 7 に該抗体が特異的に結合したことによって H I V 放出の抑制が引き起こされたものと考えられる。また、抗 CD 8 7 抗体を含む培地に A T F を添加しても抗 CD 8 7 抗体による H I V 放出抑制効果が更に増強されなかったのは、抗 CD 8 7 抗体により CD 8 7 が封鎖されこれに A T F が結合できなくなった結果であると考えられる。更に重要なことに、抗 CD 8 7 抗体及び A T F が共に T 細胞株において抗 H I V 活性 (p17) を示し、その何れもが CD 8 7 と特異的に結合する物質であることから、上記の試験結果は、CD 8 7 がそのリガンドと特異的に結合することが、細胞内の何らかのメカニズムを介して、H I V 放出 (アセンブル及び出芽) を抑制する結果

をもたらすものであることを示している。

【 0 0 7 2 】

一方、マクロファージ株であるU1及びU937の共存培養系においては（図20を参照）、抗CD87抗体の添加はATFの抗HIV活性をほぼ遮断した。またこの細胞株に対しては抗CD87抗体自身は抗HIV活性を示さなかった。従ってこれらの結果は、T細胞株での上記の結果と異なっている。しかしながら、これは、抗CD87抗体がマクロファージにおいては何らかの理由で抗HIV活性を示さず、ATFと抗CD87抗体の両方を含む培地中での細胞培養において、抗CD87抗体が単にCD87を封鎖してATFのCD87への結合を阻止したことによるものであると考えられる。従って、ATFの抗HIV活性がこれらのマクロファージ株において抗CD87抗体で遮断されたことは、ATFがCD87への結合を介してHIVの増殖を抑制しているという上記の結論をやはり支持している。

【 0 0 7 3 】

CD87とその複合体は、脂質ラフト (lipid raft) と呼ばれるスフィンゴ脂質に富む細胞表面構造上に局在しており (Koshelnic, Y. et al., Thromb. Haemost., 82(2):305-311(1999))、一方、HIVの出芽は脂質ラフト領域で選択的に行われていることが報告されている (Nguyen, D.H. et al., J. Virol., 74(7):3264-3272(2000))。また、CD87と同じく脂質ラフトに局在するThy-1は、HIVエンベロープに選択的に取り込まれることが知られている (Nguyen, D.H. et al., J. Virol., 74(7):3264-3272(2000))。これらの報告と本発明者等の実験結果とを総合すると、ATF等のCD87のリガンドが、CD87を介して脂質ラフトの構成分子に作用することによってHIVの出芽を抑制しているという可能性が示唆される。

【 0 0 7 4 】

＜製剤実施例1＞ 静脈、皮下、又は筋肉内投与用製剤

下記の処方に従って必要量の成分を混合して溶液とし、ポアサイズ0.22 $\mu$ mのメンブランフィルターにより濾過滅菌して目的の製剤とする。

ATF . . . . . 10 mg

マンニトール . . . . . 50 m g

蒸留水 . . . . . 全量 1 m L

【 0 0 7 5 】

＜製剤実施例 2＞ 静脈、皮下、又は筋肉内投与用製剤

下記の処方に従って必要量の基剤成分を混合して溶解し、これに A T F を溶解させ、所定液量とし、ポアサイズ 0.22  $\mu$  m のメンブランフィルターにより濾過滅菌して目的の製剤とする。

A T F . . . . . 50 m g

塩化ナトリウム . . . . . 8.6 m g

塩化カリウム . . . . . 0.3 m g

塩化カルシウム . . . . . 0.33 m g

注射用蒸留水 . . . . . 全量 1 m L

【 0 0 7 6 】

＜製剤実施例 3＞ 静脈、皮下、又は筋肉内投与用製剤

下記の処方に従って必要量の基剤成分を混合して溶解し、これに A T F を溶解させ、所定液量とし、ポアサイズ 0.22  $\mu$  m のメンブランフィルターにより濾過滅菌して目的の製剤とする。

A T F . . . . . 50 m g

塩化ナトリウム . . . . . 8.3 m g

塩化カリウム . . . . . 0.3 m g

塩化カルシウム . . . . . 0.33 m g

リン酸水素ナトリウム・12水塩 . . . . . 1.8 m g

1 N 塩酸 . . . . . 適量 (p H 7.4)

注射用蒸留水 . . . . . 全量 1 m L

【 0 0 7 7 】

＜製剤実施例 4＞ 静脈、皮下、又は筋肉内投与用製剤

下記の処方に従って必要量の基剤成分を混合して溶解し、これに A T F を溶解させ、所定液量とし、ポアサイズ 0.22  $\mu$  m のメンブランフィルターにより濾過滅菌して目的の製剤とする。

A T F . . . . . 50 m g  
 塩化ナトリウム . . . . . 8.3 m g  
 塩化カリウム . . . . . 0.3 m g  
 塩化カルシウム . . . . . 0.33 m g  
 グルコース . . . . . 0.4 m g  
 リン酸水素ナトリウム・12水塩 . . . . . 1.8 m g  
 1 N 塩酸 . . . . . 適量 (p H 7.4)  
 注射用蒸留水 . . . . . 全量 1 m L

【 0 0 7 8 】

< 製剤実施例 5 > 経肺投与用製剤

下記の処方に従い、A T F 及び乳糖を秤取し、120 m L の精製水に溶解させて噴霧溶液とし、常法により噴霧乾燥して経肺投与用製剤とする。

A T F . . . . . 100 m g  
乳糖 ( 1 水和物 ) . . . . . 2900 m g  
 計 3000 m g

【 0 0 7 9 】

< 製剤実施例 6 > 経肺投与用製剤

下記の処方に従い、A T F 及びヒドロキシプロピルセルロースを秤取し、120 m L の精製水に溶解させて噴霧溶液とし、常法により噴霧乾燥して経肺投与用製剤とする。

A T F . . . . . 100 m g  
ヒドロキシプロピルセルロース . . 2900 m g  
 計 3000 m g

【 0 0 8 0 】

< 製剤実施例 7 > 経肺投与用製剤

下記の処方に従い、A T F 及び水素添加レシチンを秤取し、120 m L の精製水に溶解させて噴霧溶液とし、常法により噴霧乾燥して経肺投与用製剤とする。

A T F . . . . . 100 m g  
水素添加レシチン . . . . . 2900 m g

計 3000 m g

【 0 0 8 1 】

<製剤実施例 8> 経肺投与用製剤

下記の処方に従い、A T F、ヒドロキシプロピルセルロース及びD-マンニトールを秤取し、90m Lの精製水に溶解させて噴霧溶液とし、常法により噴霧乾燥して経肺投与用製剤とする。

A T F . . . . . 240 m g

ヒドロキシプロピルセルロース . . 129 m g

D-マンニトール . . . . . 2631 m g

計 3000 m g

【 0 0 8 2 】

【発明の効果】

本発明は、感染者の体内におけるH I Vの増殖を従来とは異なった機序で抑制する、新しいタイプの抗H I V剤を提供し、それにより発症予防及び発症後の治療を含めたA I D S治療手段の選択肢を広げ、現行の抗H I V剤との併用の形でA I D S治療の有効性を改善するのに役立つ。

【 0 0 8 3 】

【配列表】

Sequence Listing

<110> JCR Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Anti-HIV agents

<130> P130-01

<160> 5

<210> 1

<211> 1296

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400> 1

atg aga gcc ctg ctg gcg cgc ctg ctt ctc tgc gtc ctg gtc gtg agc	48
Met Arg Ala Leu Leu Ala Arg Leu Leu Leu Cys Val Leu Val Val Ser	
1                      5                      10                      15	

gac tcc aaa ggc agc aat gaa ctt cat caa gtt cca tcg aac tgt gac	96
Asp Ser Lys Gly Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp	
20                      25                      30	

tgt cta aat gga gga aca tgt gtg tcc aac aag tac ttc tcc aac att	144
Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile	
35                      40                      45	

cac tgg tgc aac tgc cca aag aaa ttc gga ggg cag cac tgt gaa ata	192
His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile	
50                      55                      60	

gat aag tca aaa acc tgc tat gag ggg aat ggt cac ttt tac cga gga	240
Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg Gly	
65                      70                      75                      80	

aag gcc agc act gac acc atg ggc cgg ccc tgc ctg ccc tgg aac tct	288
Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser	
85                      90                      95	

gcc act gtc ctt cag caa acg tac cat gcc cac aga tct gat gct ctt 336  
Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu

100 105 110

cag ctg ggc ctg ggg aaa cat aat tac tgc agg aac cca gac aac cgg 384  
Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg

115 120 125

agg cga ccc tgg tgc tat gtg cag gtg ggc cta aag ccg ctt gtc caa 432  
Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln

130 135 140

gag tgc atg gtg cat gac tgc gca gat gga aaa aag ccc tcc tct cct 480  
Glu Cys Met Val His Asp Cys Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro

145 150 155 160

cca gaa gaa tta aaa ttt cag tgt ggc caa aag act ctg agg ccc cgc 528  
Pro Glu Glu Leu Lys Phe Gln Cys Gly Gln Lys Thr Leu Arg Pro Arg

165 170 175

ttt aag att att ggg gga gaa ttc acc acc atc gag aac cag ccc tgg 576  
Phe Lys Ile Ile Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile Glu Asn Gln Pro Trp

180 185 190

ttt gcg gcc atc tac agg agg cac cgg ggg ggc tct gtc acc tac gtg 624  
Phe Ala Ala Ile Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr Tyr Val

195 200 205

tgt gga ggc agc ctc atc agc cct tgc tgg gtg atc agc gcc aca cac 672  
 Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala Thr His  
 210 215 220

tgc ttc att gat tac cca aag aag gag gac tac atc gtc tac ctg ggt 720  
 Cys Phe Ile Asp Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val Tyr Leu Gly  
 225 230 235 240

cgc tca agg ctt aac tcc aac acg caa ggg gag atg aag ttt gag gtg 768  
 Arg Ser Arg Leu Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met Lys Phe Glu Val  
 245 250 255

gaa aac cta atc cta cac aag gac tac agc gct gac acg ctt gct cac 816  
 Glu Asn Leu Ile Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala Asp Thr Leu Ala His  
 260 265 270

cac aac gac att gcc ttg ctg aag atc cgt tcc aag gag ggc agg tgt 864  
 His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg Ser Lys Glu Gly Arg Cys  
 275 280 285

gcg cag cca tcc cgg act ata cag acc atc tgc ctg ccc tcg atg tat 912  
 Ala Gln Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr Ile Cys Leu Pro Ser Met Tyr  
 290 295 300

aac gat ccc cag ttt ggc aca agc tgt gag atc act ggc ttt gga aaa 960  
 Asn Asp Pro Gln Phe Gly Thr Ser Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly Lys  
 305 310 315 320

gag aat tct acc gac tat ctc tat ccg gag cag ctg aaa atg act gtt 1008



Glu Asn Ser Thr Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr Val

325

330

335

gtg aag ctg att tcc cac cgg gag tgt cag cag ccc cac tac tac ggc 1056

Val Lys Leu Ile Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly

340

345

350

tct gaa gtc acc acc aaa atg ctg tgt gct gct gac cca cag tgg aaa 1104

Ser Glu Val Thr Thr Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys

355

360

365

aca gat tcc tgc cag gga gac tca ggg gga ccc ctc gtc tgt tcc ctc 1152

Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu

370

375

380

caa ggc cgc atg act ttg act gga att gtg agc tgg ggc cgt gga tgt 1200

Gln Gly Arg Met Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys

385

390

395

400

gcc ctg aag gac aag cca ggc gtc tac acg aga gtc tca cac ttc tta 1248

Ala Leu Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser His Phe Leu

405

410

415

ccc tgg atc cgc agt cac acc aag gaa gag aat ggc ctg gcc ctc tga 1296

Pro Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu

420

425

430

<210> 2

<211> 431

<212> PTN

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Ala Leu Leu Ala Arg Leu Leu Leu Cys Val Leu Val Val Ser

1 5 10 15

Asp Ser Lys Gly Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp

20 25 30

Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile

35 40 45

His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile

50 55 60

Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg Gly

65 70 75 80

Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser

85 90 95

Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu

100 105 110

Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg

115 120 125

Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln

130

135

140

Glu Cys Met Val His Asp Cys Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro

145

150

155

160

Pro Glu Glu Leu Lys Phe Gln Cys Gly Gln Lys Thr Leu Arg Pro Arg

165

170

175

Phe Lys Ile Ile Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile Glu Asn Gln Pro Trp

180

185

190

Phe Ala Ala Ile Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr Tyr Val

195

200

205

Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala Thr His

210

215

220

Cys Phe Ile Asp Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val Tyr Leu Gly

225

230

235

240

Arg Ser Arg Leu Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met Lys Phe Glu Val

245

250

255

Glu Asn Leu Ile Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala Asp Thr Leu Ala His

260

265

270

His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg Ser Lys Glu Gly Arg Cys

275

280

285

Ala Gln Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr Ile Cys Leu Pro Ser Met Tyr  
290 295 300

Asn Asp Pro Gln Phe Gly Thr Ser Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Asn Ser Thr Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr Val  
325 330 335

Val Lys Leu Ile Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly  
340 345 350

Ser Glu Val Thr Thr Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys  
355 360 365

Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu  
370 375 380

Gln Gly Arg Met Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys  
385 390 395 400

Ala Leu Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser His Phe Leu  
405 410 415

Pro Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu  
420 425 430

<210> 3

<211> 4

<212> PTN

<213> Homo sapience

<400> 3

Lys Lys Phe Gly

4

<210> 4

<211> 12

<212> PTN

<213> Homo sapience

<400> 4

Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro

12

<210> 5

<211> 10

<212> PTN

<213> Homo sapience

<400> 5

Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gln

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】 ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクティベーター及び A T F の一次構造を示す。

【図 2】 pSEAP-Basic の構造を示す。

【図 3】 pREP7 の構造を示す。

【図 4】 pSBR の構造を示す。

【図 5】 pNL4-3 の構造及び P C R による増幅部位を示す。

【図 6】 pSBR-HIVの構造を示す。

【図 7】 ヒドロキシアパタイトカラムからの各溶出画分の抗H I V活性及び該画分に対応するタンパク質濃度を示すグラフ。

【図 8】 ヒドロキシアパタイトカラムからの各溶出画分のSDS/PAGE泳動像を示す。

【図 9】 ヒト尿由来ウロキナーゼ原体のHiPrep Sephacryl S-100カラムからの各溶出画分の抗H I V活性及び該画分に対応するタンパク質濃度を示すグラフ。

【図 1 0】 ヒト尿由来ウロキナーゼ原体のHiPrep Sephacryl S-100カラムからの各溶出画分のSDS/PAGE泳動像を示す。

【図 1 1】 共存培養（T細胞株）における抗H I V活性測定（p17）の結果を示すグラフ。

【図 1 2】 共存培養（マクロファージ株）における抗H I V活性測定（p17）の結果を示すグラフ。

【図 1 3】 非感染細胞培養（MC141）におけるSEAPレポーターアッセイの結果を示すグラフ。

【図 1 4】 非感染細胞培養（CL35）におけるSEAPレポーターアッセイの結果を示すグラフ。

【図 1 5】 感染性H I V-DNAの一過性トランスフェクションアッセイの結果を示すグラフ。

【図 1 6】 持続感染細胞（U1）の単独培養アッセイの結果を示すグラフ。

【図 1 7】 急性感染後の日数経過に伴うH I V量の変化を示すグラフ。

【図 1 8】 A T Fによるウイルス増殖抑制を、感染後の各経過日数別に示すグラフ。

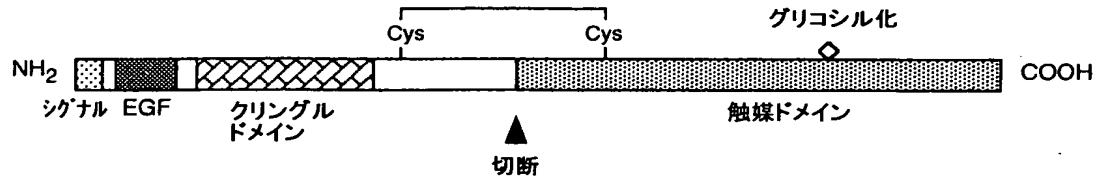
【図 1 9】 T細胞株におけるA T Fの抗H I V活性に対する抗CD87抗体の影響を示すグラフ。

【図 2 0】 マクロファージ株におけるA T Fの抗H I V活性に対する抗CD87抗体の影響を示すグラフ。

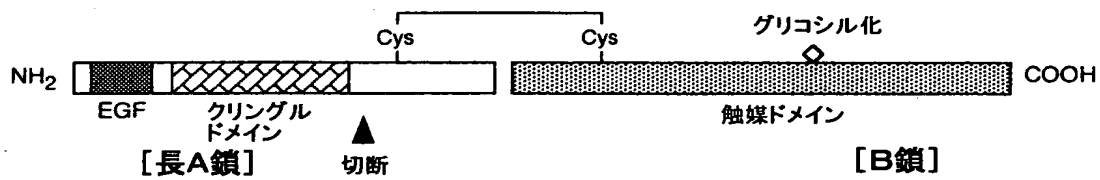
【書類名】 図面

【図 1】

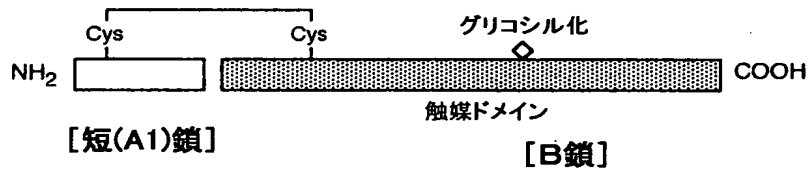
(a) sc-uPA



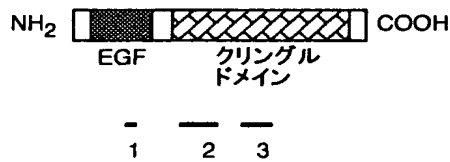
(b) HMW-uPA



(c) LMW-uPA

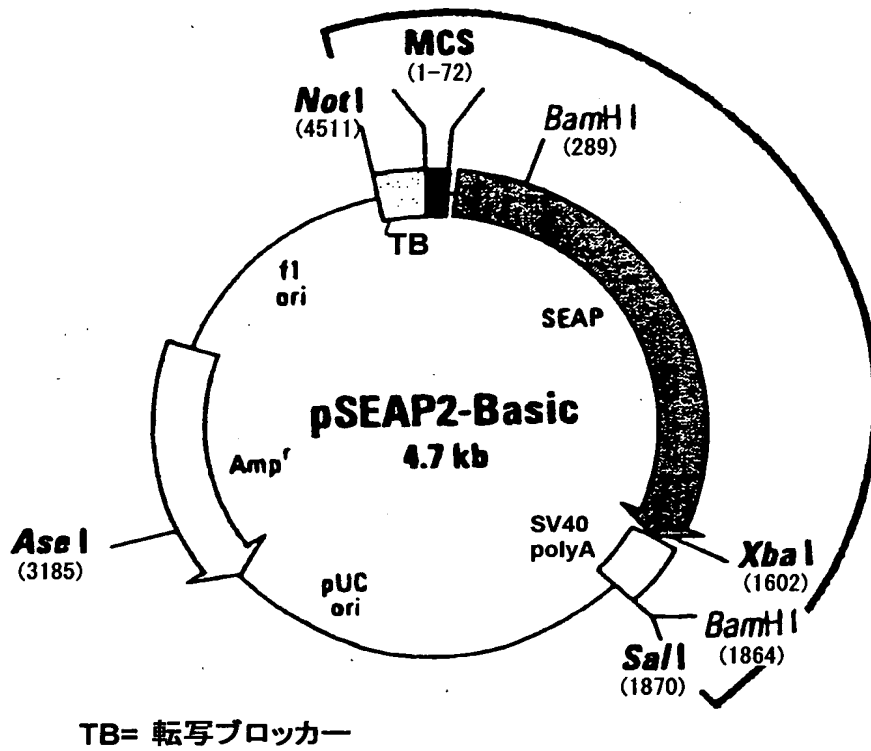


(d) ATF



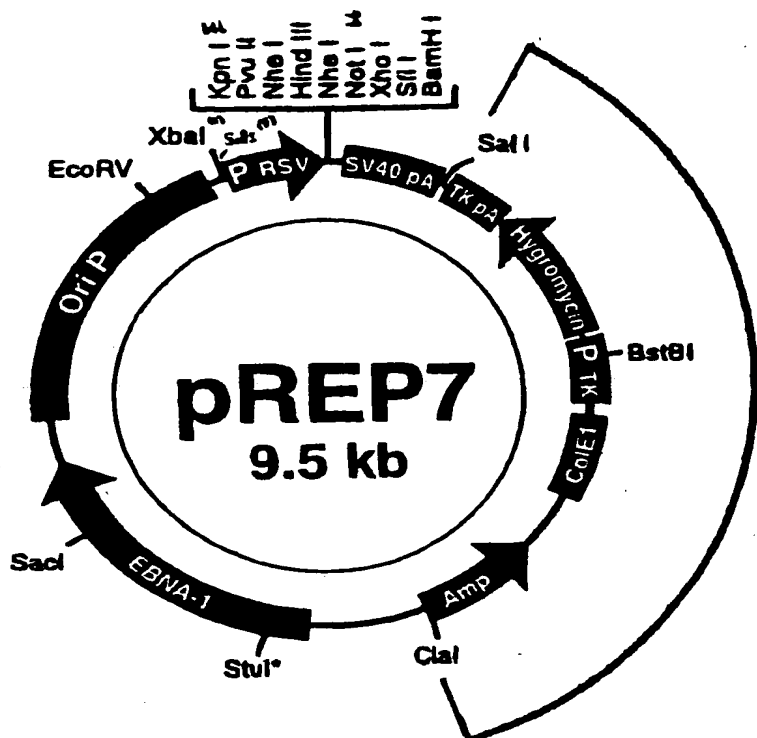
1: KKFG  
2: ASTDTMGRPCLP  
3: RRPWCYVQVQ

【図 2】

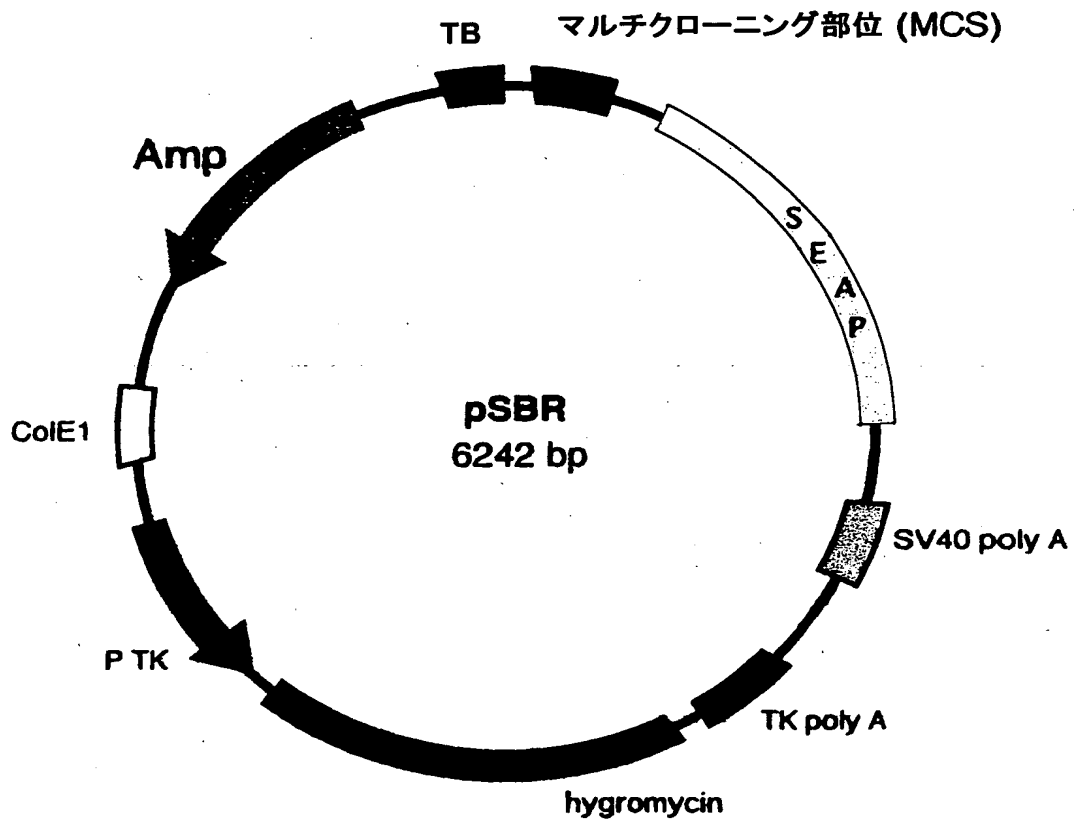




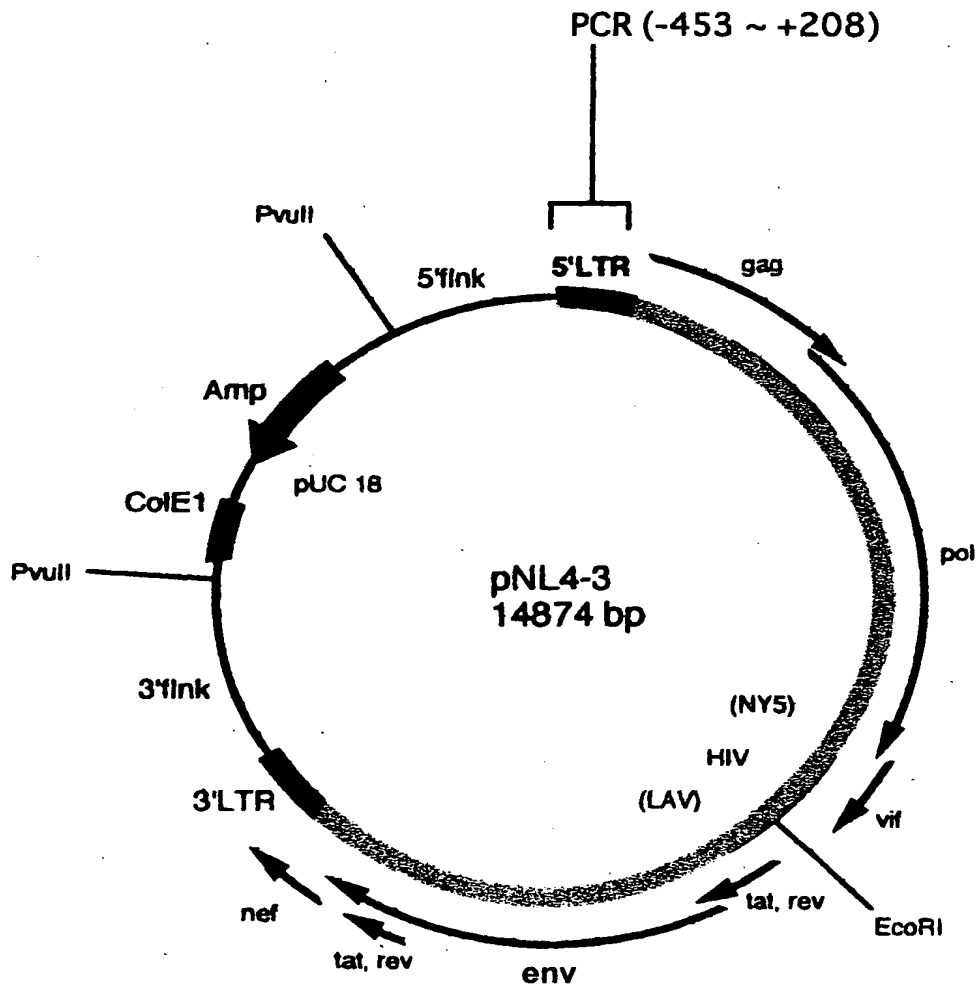
【図3】



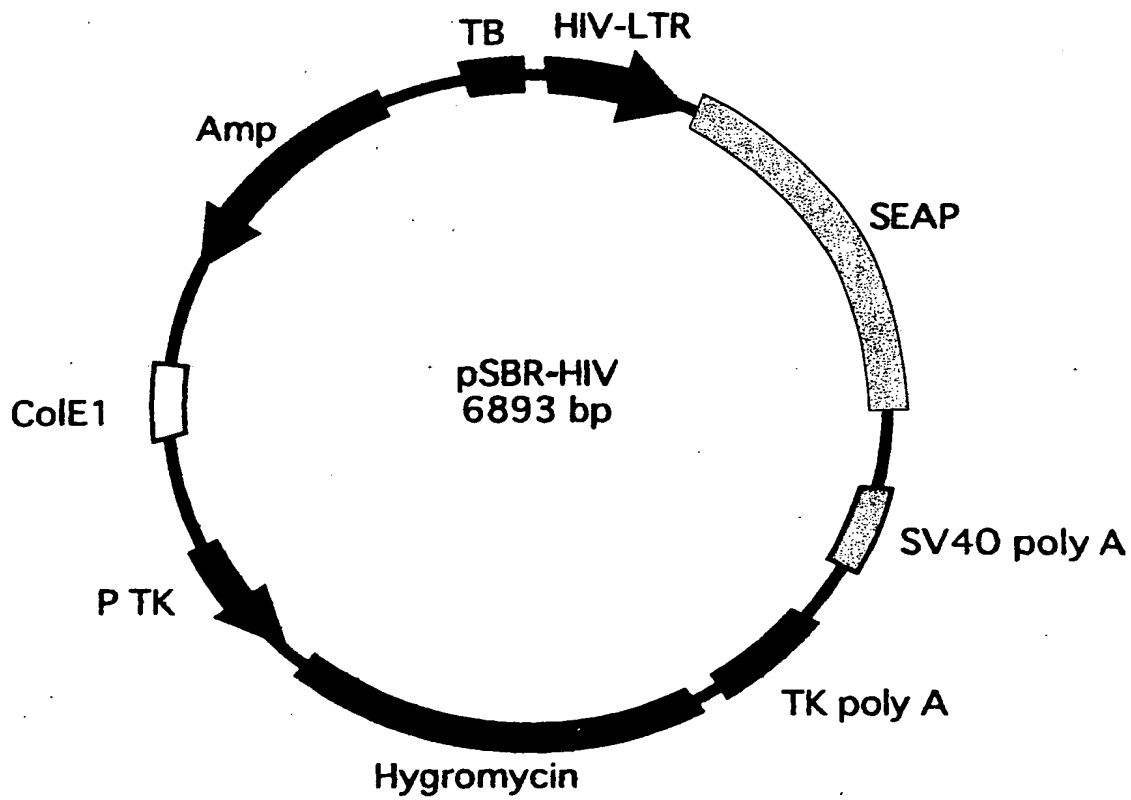
【図4】



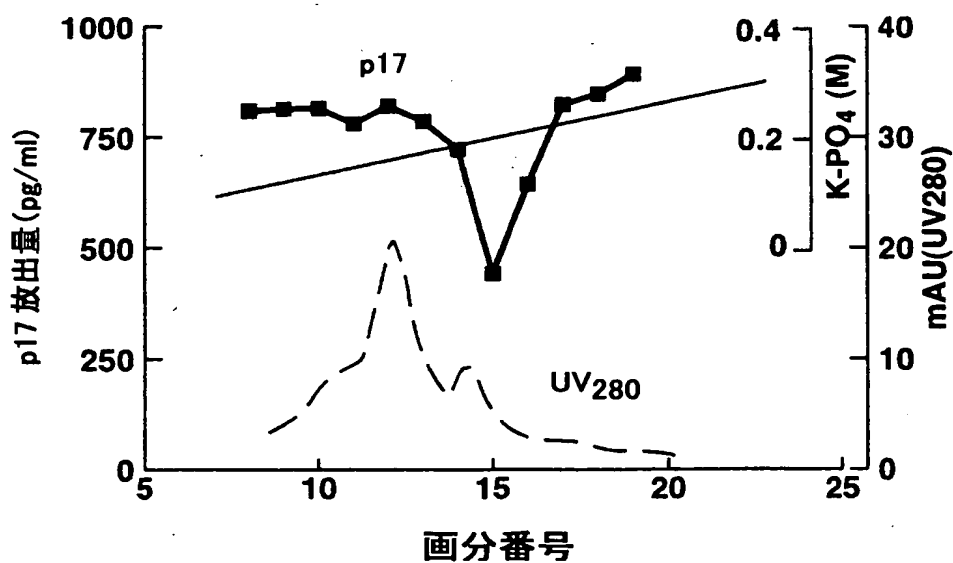
【図 5】



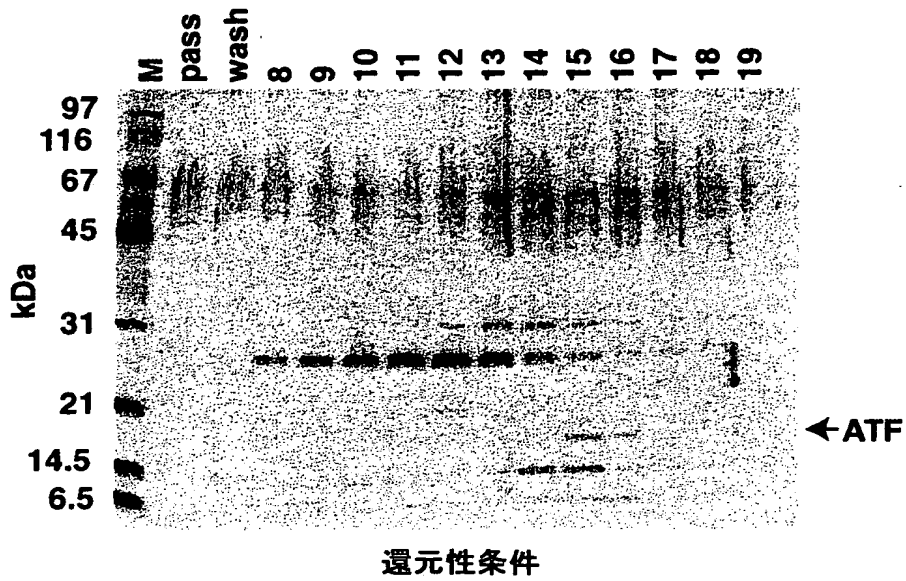
【図 6】



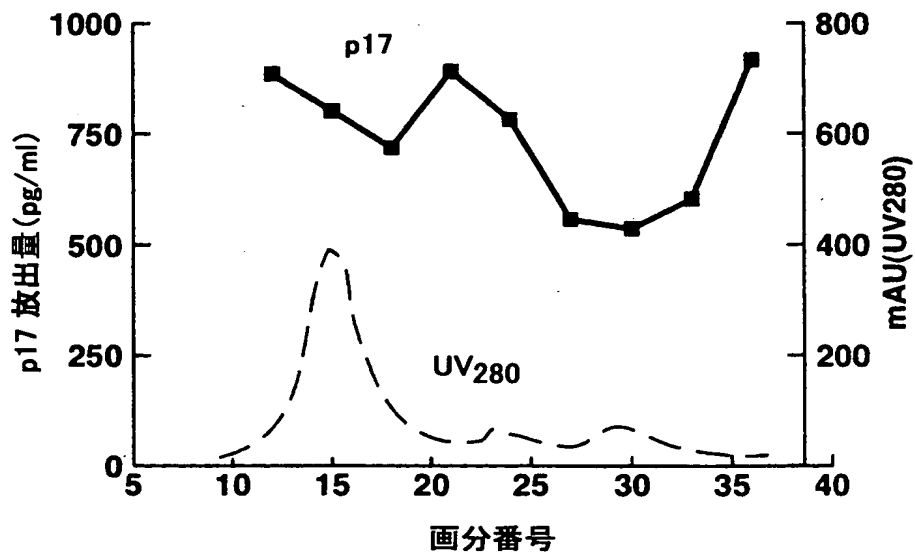
【図 7】



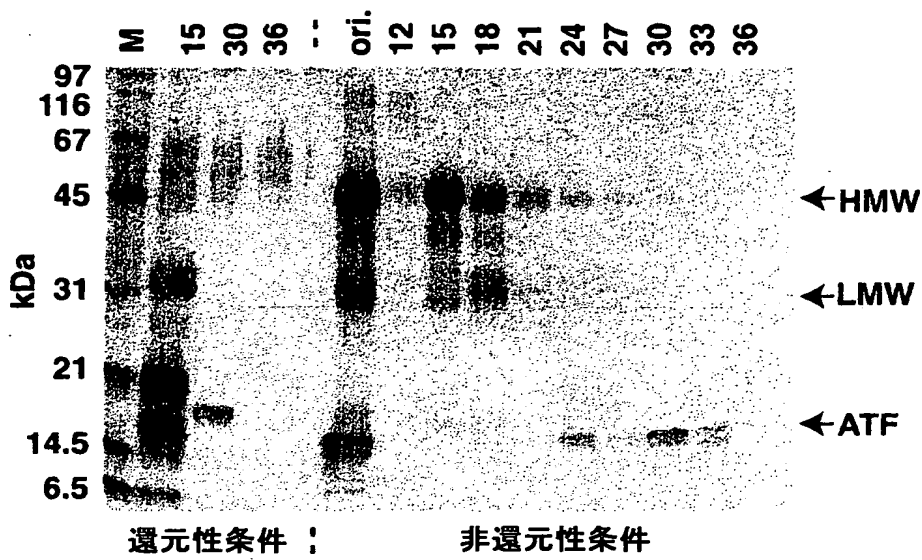
【図 8】



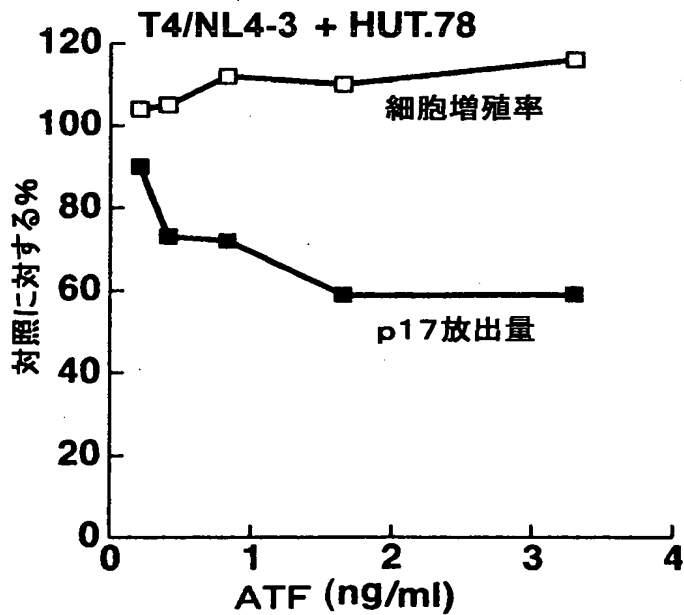
【図 9】



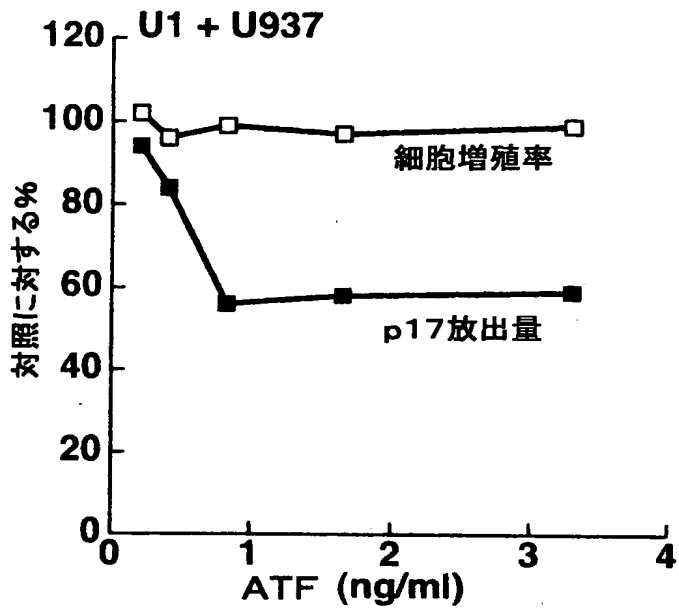
【図10】



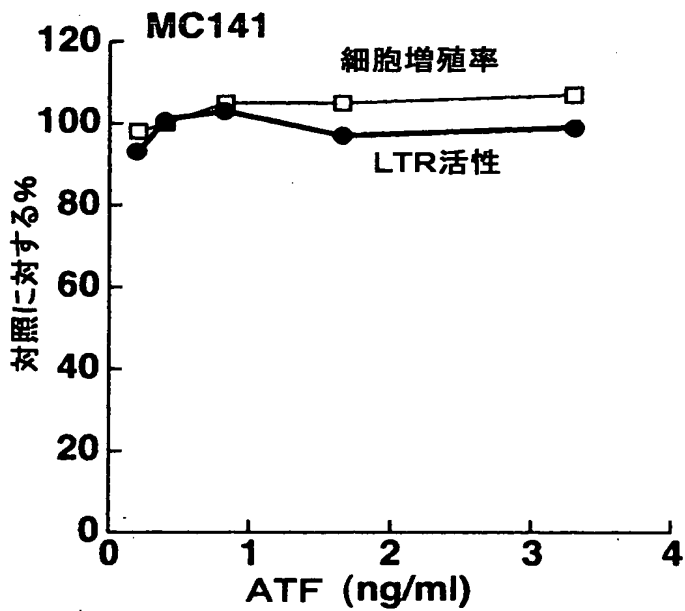
【図11】



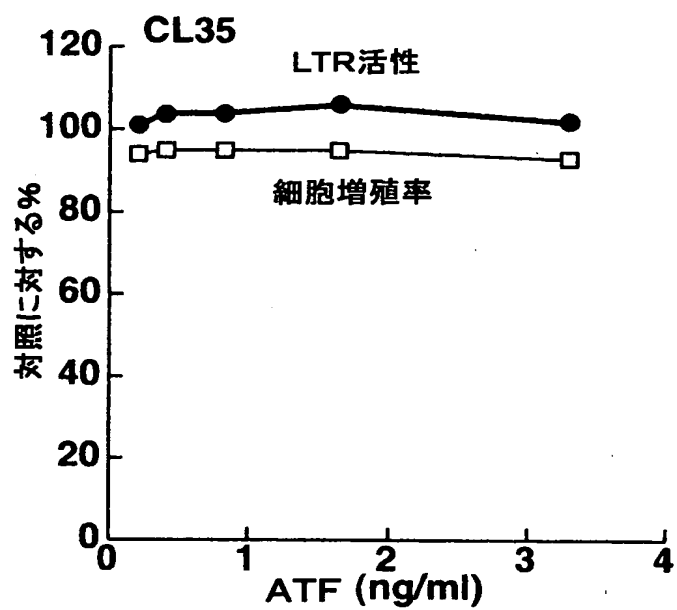
【図 1 2】



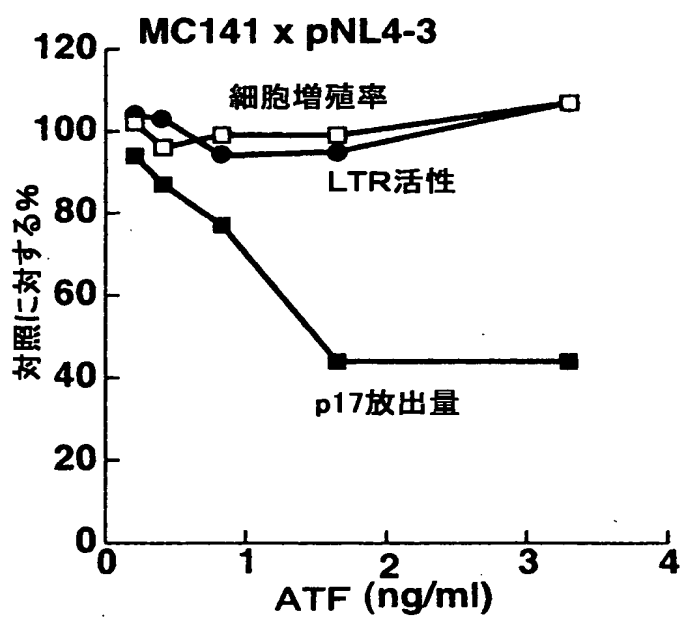
【図 1 3】



【図14】

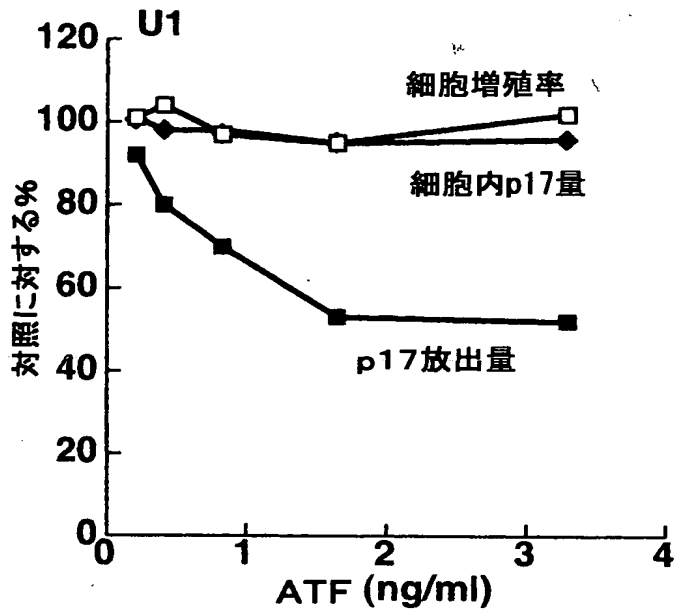


【図15】

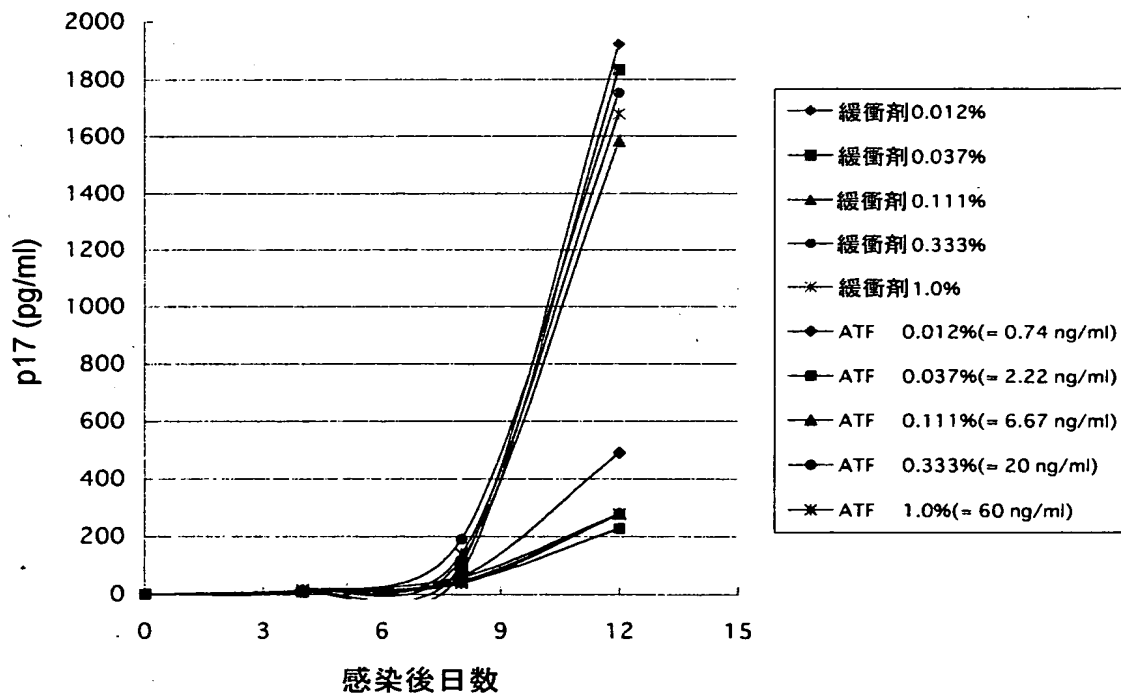




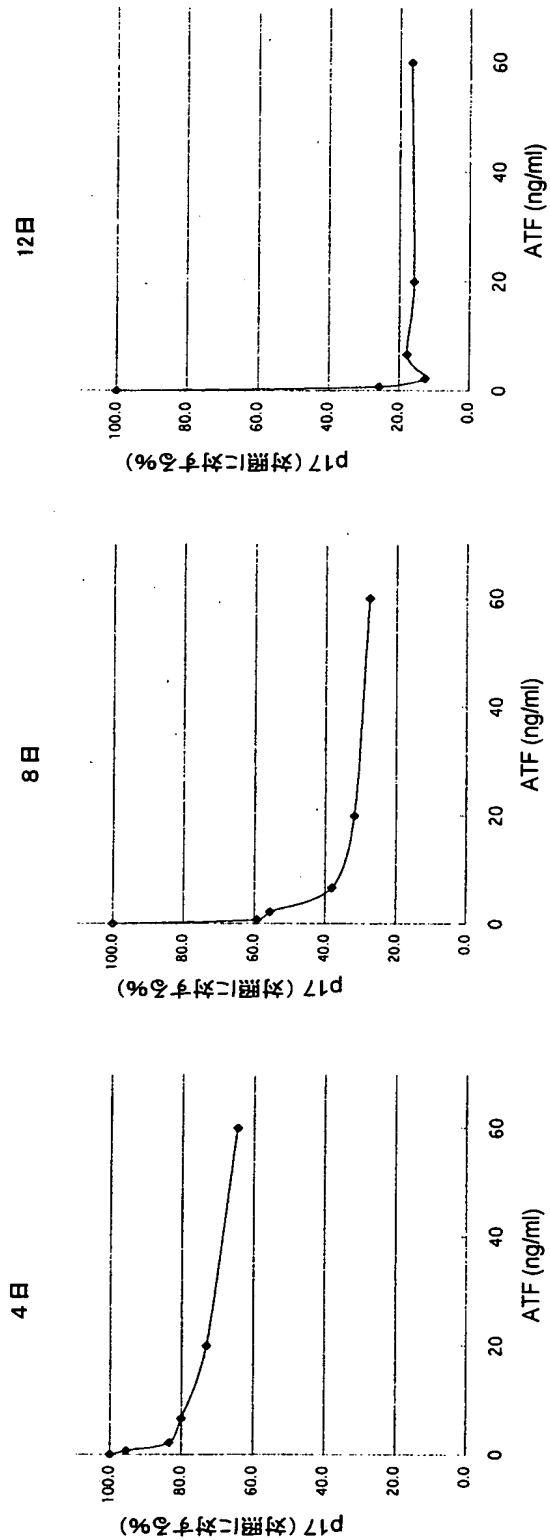
【図 16】



【図 17】

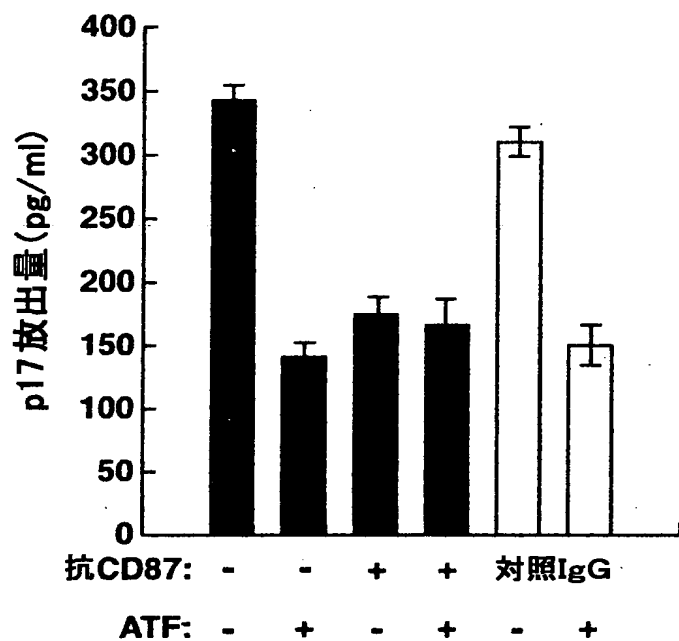


【図 18】



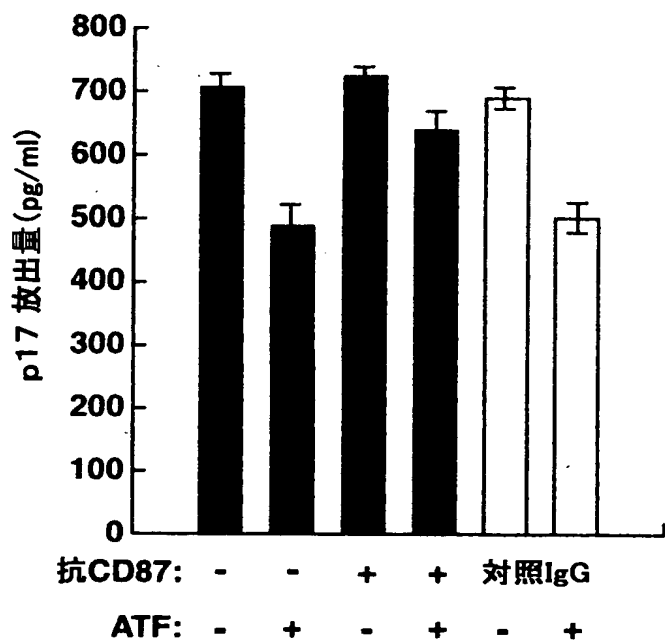
【図19】

**T4/NL4-3 + HUT.78**



【図20】

**U1 + U937**



特 2 0 0 1 - 1 8 4 2 8 4

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来とは異なった作用機序に基づく抗H I V剤を提供すること

【解決手段】 有効成分として、高分子量ウロキナーゼ型プラスミノーゲン  
アクティベーター、そのアミノ末端断片、それらの類縁体及び抗C D 8 7抗体で  
あってよい、C D 8 7に対するリガンドを含むことを特徴とする、抗H I V剤。

【選択図】 なし

特 2001-184284

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2001-184284
受付番号	50100880931
書類名	特許願
担当官	第三担当上席 0092
作成日	平成13年 6月22日

### <認定情報・付加情報>

【提出日】	平成13年 6月19日
-------	-------------

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000228545]

1. 変更年月日	1994年11月30日
[変更理由]	住所変更
住 所	兵庫県芦屋市春日町3番19号
氏 名	日本ケミカルリサーチ株式会社